EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

BUĞDAYDA KAHVERENGİ PASA DAYANIKLILIK GENLERİ İLE İLGİLİ MOLEKÜLER MARKÖRLER ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

Fatma AYKUT

Tarla Bitkileri Anabilim Dalı
Bilim Dalı Kodu: 501.12.01
Sunuş Tarihi: 01.06.2007

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Süer YÜCE

Bornova-İZMİR

III

Fatma AYKUT tarafından DOKTORA TEZİ olarak sunulan "**Buğdayda Kahverengi Pasa Dayanıklılık Genleri İle İlgili Moleküler Markörler Üzerinde Araştırmalar"** başlıklı 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 01.06.2007 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/çokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri **İmza**

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Süer YÜCE
Raportör Üye: Prof. Dr. Güldehen BİLGEN
Üye : Prof. Dr. Muzaffer TOSUN
Üye : Prof. Dr. İsmail TURGUT
Üye : Prof. Dr. Metin ALTINBAŞ

V

ÖZET

BUĞDAYDA KAHVERENGİ PASA DAYANIKLILIK GENLERİ İLE İLGİLİ MOLEKÜLER MARKÖRLER ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

AYKUT, Fatma

Doktora Tezi, Tarla Bitkileri Bölümü

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Süer YÜCE

Haziran 2007, 213 sayfa

Bu çalışmada markörler yardımıyla seleksiyonda kullanabilmek için, kahverengi pas dayanıklılık geni *Lr13*'e ait moleküler markörleri geliştirmek amaçlanmıştır. CIMMYT'ten temin edilmiş ve her biri farklı bir kahverengi pas dayanıklılık geni taşıyan 41 adet Thatcher yakın izogenik hattı materyal olarak kullanılmıştır. Ayrıca, duyarlı yerli çeşit İzmir 85 ile *Lr13* genini taşıyan 12 No'lu dayanıklı hat (Tc*6/Frontana) arasında melezleme yapılmış ve bunların F_1 generasyonu ile bu ebeveynler çalışmanın diğer bir materyalini oluşturmuştur. Thatcher yakın izogenik hatlarından oluşturulan DNA ve DNA bulklarında ve belirtilen tüm bu materyalde AFLP ve SSR markörleri incelenmiş ve *Lr13* genine ait markör belirlenmeye çalışılmıştır.

DNA ve DNA bulklarında toplam 246 AFLP primer kombinasyonu kullanılmış ve bunlardan 28 adedi 12 No'lu hatta toplam 33 farklı polimorfik bant deseni sergilemiştir. Çalışmanın SSR analizleri kısmında 7 primer kullanılmış bunlarda sadece 2 tanesi DNA ve DNA bulklarında

polimorfizm oluşturmuşlardır. Polimorfik bant deseni sergileyen bu primerler yakın izogenik hatlarda ve ebeveynlerle birlikte F_1 generasyonunda tekrar incelenmiştir.

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 verdiği gözlenmiş ve bu primerlerin incelenen materyalde *Lr13* genine aday markörler verebileceği belirlenmiştir.

Ayrıca ekmeklik buğdayda AFLP ve SSR tekniklerinin kahverengi pas dayanıklılık genlerini araştırmada yararlı olduğu saptanmıştır. 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 varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: AFLP markörleri, buğday, kahverengi pas, *Lr13*, SSR markörleri, Thatcher yakın izogenik hatları.

ABSTRACT

RESEARCHES ON MOLECULAR MARKERS RELATED TO BROWN RUST RESISTANCE GENES IN WHEAT

AYKUT, Fatma
Ph. D. Thesis, Field Crops Department
Supervisor: Prof. Dr. Süer YÜCE
June 2007, 213 pages

The objective of this study was to develop the molecular markers linked to brown rust resistance gene *Lr13* in order to use in marker-assisted selection. 41 Thatcher near isogenic lines obtained from CIMMYT and of which each contains different brown rust resistance gene were used as genetic material for this study. In addition, a cross was made between susceptible local variety Izmir 85 and the line of 12 number (Tc*6/Frontana) that contain *Lr13* gene and F_1 generation of this cross with the parents were the other material to evaluate. AFLP and SSR markers were investigated and tried to identify a marker linked to *Lr13* in the DNA and DNA bulks constructed from Thatcher near isogenic lines and also all of the material.

Total 246 primer combinations were used in DNA and DNA bulks and 28 of them showed the total 33 different polymorphic band pattern in the line of 12 number. The 12 SSR primers were screened in SSR analyses and two of them constituted polymorphism in DNA and DNA

bulks. These primers revealed polymorphic band pattern were investigated again in near isogenic lines and F_1 generation together with parents.

The results indicated that the 6 AFLP primer combinations and a microsatellite primer Wms 630 produced simply the specific bands for the line of 12 number, and it was determined that these primers can be markers candidate to *Lr13*.

Besides, AFLP and SSR techniques were found to be useful to search for brown rust resistance genes in bread wheat. It was concluded that Thatcher near isogenic lines which contain different resistance genes have a narrow genetic frame, and therefore, they could provide well focusing to identify the interested resistance gene.

Key Words: AFLP markers, wheat, brown rust, *Lr13*, SSR markers, Thatcher near isogenic lines.

TEŞEKKÜR

Bu tür bir araştırma yapmama olanak veren ve çalışmalarım süresince her türlü desteği sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Süer Yüce'ye, çalışmamın laboratuar aşamasında hiçbir olanağını esirgemeyen Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Friedt'e (Justus-Liebig University, Institute of Agronomy and Plant Breeding I), inokülasyon çalışmalarında yardımcı olan Prof. Dr. Frank Ordon'a (Institute of Epidemiology and Resistance Resources), laboratuar çalışmalarımda tecrübelerinden yararlandığım Dr. Carola Wagner, Dr. Katrin Humbroich, Markus Rhiel ve Annette Plank'e (Justus-Liebig University, Institute of Agronomy and Plant Breeding I) ve beni her zaman destekleyen, daima yanımda olan aileme ve iş arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET……V
ABSTRACT……VII
TEŞEKKÜR……IX
ŞEKİLLER DİZİNİ……XIII
ÇİZELGELER DİZİNİ……XIX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ……XX
1. GİRİŞ……1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR……7
2.1. Buğday (Triticum *aestivum* L.)……7
2.2. Buğday Pas Hastalıkları ve Kahverengi Pas……8
2.3. Buğdayda Kahverengi Pas Dayanıklılığı……14
2.4. Moleküler Markörler……23
2.5. SSR (Mikrosatelit) Markörleri……35
2.6. AFLP Markörleri……41
3. MATERYAL VE METOD……53
3.1. Materyal……53
3.1.1. Bitki Materyali……53
3.1.2. Deneme Yerinin Özellikleri……57
3.1.3. İklim Durumu……59
3.2. Yöntem……61
3.2.1. Melezleme ve İnokülasyon Çalışmaları……61
3.2.2. İnokülasyon Çalışmaları……66

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa

3.2.3. DNA Analizleri……...68
3.2.3.1. DNA İzolasyonu……...69
3.2.3.2. DNA Miktar Tayini……72
3.2.3.3. Bulkların Oluşturulması……..72
3.2.3.4. AFLP Markörleri……74
3.2.3.4.1. Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzimleri ile Kesilmesi……..75
3.2.3.4.2. Adaptörlerin Bağlanması……...75
3.2.3.4.3. +0 Ön Amplifikasyonu……..76
3.2.3.4.4. +1 Ön Amplifikasyonu……..77
3.2.3.4.5. +3 Amplifikasyonu (Seçici Amplifikasyon)……..77
3.2.3.4.6. Poliakrilamid Jel Elektroforezi……..87
3.2.3.4.7. Dayanıklı Yakın İzogenik Hatlarda AFLP Analizleri…….89
3.2.3.5. SSR Markörleri……..90
4. BULGULAR VE TARTIŞMA……93
4.1. AFLP Analizlerine Ait Bulgular……...93
4.2. SSR Analizlerine Ait Bulgular……182
5. SONUÇ VE ÖNERİLER……...194
KAYNAKLAR DİZİNİ…….199
ÖZGEÇMİŞ……..213

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Yaprak yüzeyinde kahverengi pas püstülleri……...10
Şekil 2.2. Kahverengi pas fungusunun yaşam çemberi……12
Şekil 2.3. Genotipler arasında kodominant ve dominant DNA Markörleri……27
Şekil 2.4. Dominant ve kodominant markörlerin karşılaştırılması……28
Şekil 2.5. SSR markörlerinin şematik gösterimi……..36
Şekil 2.6. AFLP markörlerinin şematik gösterimi……42
Şekil 3.1. Deneme tarlasından bir görünüm……58
Şekil 3.2. Emaskülasyon yapılan bir başak (a) ile melezlenmiş bir başak (b)……63
Şekil 3.3. SSR ve AFLP analizlerinde kullanılan standart DNA'lar……92
Şekil 4.1. E31-E32 primerlerinin M51-M53-M55 ile kombinasyonu……94
Şekil 4.2. E32 M53 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları……95
Şekil 4.3. E32 M53 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları……96
Şekil 4.4. E32 M53 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları……..96
Şekil 4.5. E31-E32 primerlerinin M56-M57-M58 ile kombinasyonu……97
Şekil 4.6. E31 M56 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları……98
Şekil 4.7. E31 M56 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları……....98
Şekil 4.8. E31 M56 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları……99
Şekil 4.9. E32 M56 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları……99
Şekil 4.10. E32 M56 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları……100
Şekil 4.11. E32 M56 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları……..101
Şekil 4.12. E39-E40 primerlerinin M55-M56-M57 ile kombinasyonu..102
Şekil 4.13. E39 M57 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları…103
Şekil 4.14. E39 M57 primer kombinasyonunun DNA ve DNA
Şekil 4.15. E39 M57 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları……..104

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.16. E33-E34 primerlerinin M63-M64-M66 ile kombinasyonu..105
Şekil 4.17. E33 M63 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları…106
Şekil 4.18. E33 M63 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları……107
Şekil 4.19. E33 M63 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları……..107
Şekil 4.20. E31-E32 primerlerinin M63-M64-M66 ile kombinasyonu..108
Şekil 4.21. E32 M63 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları (1. bant)……109
Şekil 4.22. E32 M63 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları (1. bant).....110
Şekil 4.23. E32 M63 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları (1. bant).....110
Şekil 4.24. E32 M63 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları (2. bant).....111
Şekil 4.25. E32 M63 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları (2. bant).....111
Şekil 4.26. E32 M63 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları (2. bant).....112
Şekil 4.27. E31-E32 primerlerinin M67-M68-M69 ile kombinasyonu..113
Şekil 4.28. E32 M69 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları....114
Şekil 4.29. E32 M69 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları …….....115
Şekil 4.30. E32 M69 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları …….....115
Şekil 4.31. E33-E34 primerlerinin M70-M71-M73 ile kombinasyonu..116
Şekil 4.32. E34 M70 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları....117
Şekil 4.33. E34 M70 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.....118
Şekil 4.34. E34 M70 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları …….....118
Şekil 4.35. E34 M71 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları (1. bant).....119

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.36. E34 M71 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları (1. bant).....119
Şekil 4.37. E34 M71 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları (1. bant).....120
Şekil 4.38. E34 M71 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları (2. bant).....120
Şekil 4.39. E34 M71 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları (2. bant).....121
Şekil 4.40. E34 M71 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları (2. bant).....122
Şekil 4.41. E43-E45 primerlerinin M63-M64-M66 ile kombinasyonu..123
Şekil 4.42. E45 M66 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları....124
Şekil 4.43. E45 M66 primer kombinasyonunun bulklarda sonuçları.....125
Şekil 4.44. E43-E45 primerlerinin M67-M68-M69 ile kombinasyonu..126
Şekil 4.45. E45 M67 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları....127
Şekil 4.46. E45 M67 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.....128
Şekil 4.47. E45 M67 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.....128
Şekil 4.48. E45 M68 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları....129
Şekil 4.49. E45 M68 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.....129
Şekil 4.50. E45 M68 primer kombinasyonunun ebeveynlerde ve F_1'deki sonuçları.....130
Şekil 4.51. E43-E45 primerlerinin M74-M75-M78 ile kombinasyonu..131
Şekil 4.52. E43 M74 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları....132
Şekil 4.53. E43 M74 primer kombinasyonunun bulklarda sonuçları.....133
Şekil 4.54. E43 M74 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.....133
Şekil 4.55. E43 M75 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları....134
Şekil 4.56. E43 M75 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.....134

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.57. E43 M75 primer kombinasyonunun ebeveynlerde ve F_1'de sonuçları.....135
Şekil 4.58. E31-E32 primerlerinin M74-M75-M78 ile kombinasyonu..136
Şekil 4.59. E32 M74 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları....137
Şekil 4.60. E32 M74 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.....138
Şekil 4.61. E32 M74 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.....138
Şekil 4.62. E47-E49 primerlerinin M66-M67-M69 ile kombinasyonu..139
Şekil 4.63. E49 M67 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları....140
Şekil 4.64. E49 M67 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.....141
Şekil 4.65. E49 M67 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.....141
Şekil 4.66. E47 M69 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları....142
Şekil 4.67. E47 M69 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.....142
Şekil 4.68. E47 M69 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.....143
Şekil 4.69. E47-E49 primerlerinin M63-M64-M68 ile kombinasyonu..144
Şekil 4.70. E47 M64 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları (1. bant).....145
Şekil 4.71. E47 M64 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları (1. bant).....146
Şekil 4.72. E47 M64 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları (1. bant).....146
Şekil 4.73. E47 M64 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları (2. bant).....147
Şekil 4.74. E47 M64 primer kombinasyonunun bulklarda sonuçları (2. bant).....147
Şekil 4.75. E47 M64 primer kombinasyonunun ebeveynlerde ve F_1'deki sonuçları (2. bant).....148

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.76. E47 M68 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları....148
Şekil 4.77. E47 M68 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.....149
Şekil 4.78. E47 M68 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.....149
Şekil 4.79. E49 M68 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları....150
Şekil 4.80. E49 M68 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.....150
Şekil 4.81. E49 M68 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.....151
Şekil 4.82. E55-E56 primerlerinin M71-M74-M75 ile kombinasyonu..152
Şekil 4.83. E56 M71 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları....153
Şekil 4.84. E56 M71 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.....154
Şekil 4.85. E56 M71 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.....154
Şekil 4.86. E51-E52 primerlerinin M63-M66-M67 ile kombinasyonu..155
Şekil 4.87. E51 M63 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları....156
Şekil 4.88. E51 M63 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.....157
Şekil 4.89. E51 M63 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.....157
Şekil 4.90. E52 M63 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları....158
Şekil 4.91. E52 M63 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.....158
Şekil 4.92. E52 M63 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.....159
Şekil 4.93. E51-E52 primerlerinin M78-M79-M80 ile kombinasyonu..160
Şekil 4.94. E51 M80 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları....161
Şekil 4.95. E51 M80 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.....162
Şekil 4.96. E51 M80 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.....162

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.97. E57-E58 primerlerinin M63-M64-M67 ile kombinasyonu..163
Şekil 4.98. E58 M67 primer kombinasyonunun bulklarda sonuçları.....164
Şekil 4.99. E57-E58 primerlerinin M69-M71-M74 ile kombinasyonu..165
Şekil 4.100. E57 M69 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları..166
Şekil 4.101. E57 M69 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.....167
Şekil 4.102. E57 M69 primer kombinasyonunun ebeveynlerde ve F_1'deki sonuçları.....168
Şekil 4.103. E57 M74 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları..169
Şekil 4.104. E57 M74 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.....169
Şekil 4.105. E57 M74 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.....170
Şekil 4.106. E41-E42 primerlerinin M70-M71-M73 ile kombinasyonu171
Şekil 4.107. E41 M70 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları..172
Şekil 4.108. E41 M70 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.....173
Şekil 4.109. E41 M70 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.....174
Şekil 4.110. E32M56, E32M69, E32M74 ve E39 M57 ve E43 M74 primer kombinasyonlarının ebeveynler ile F_1'deki sonuçları.……179
Şekil 4.111. Wms 120 primerinin ebeveynler, F_1 ve DNA ve DNA bulklarında sonuçları.....182
Şekil 4.112. Wms 120 primerinin dayanıklı hatlarda sonuçları.....183
Şekil 4.113. Wms 319 primerinin ebeveynler, F_1 ve DNA ve DNA bulklarında sonuçları.....184
Şekil 4.114. Wms 319 primerinin dayanıklı hatlarda sonuçları.....185
Şekil 4.115. Wms 388 primerinin ebeveynler, F_1 ve DNA ve DNA bulklarında sonuçları.....185
Şekil 4.116. Wms 388 primerinin dayanıklı hatlarda sonuçları.....186
Şekil 4.117. Wms 630 primerinin ebeveynler, F_1 ve DNA ve DNA bulklarında sonuçları.....187
Şekil 4.118. Wms 630 primerinin dayanıklı hatlarda sonuçları.....188

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 2.1. Tahıllarda sıkça kullanılan DNA markörlerinin karşılaştırılması……...26
Çizelge 3.1. CIMMYT'den temin edilen Thatcher yakın izogenik hatları…….53
Çizelge 3.2. Deneme tarlası toprağının bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri……..58
Çizelge 3.3. Bornova iklim verileri (2003-2005 yılları ve çok yıllık ortalamalar)……..……60
Çizelge 3.4. DNA ekstraksiyon tamponu [Doyle and Doyle (CTAB)]....70
Çizelge 3.5. Thatcher yakın izogenik hatlarından oluşturulan DNA ve DNA bulkları……....73
Çizelge 3.6. +0 ve +1 ön amplifikasyonunda uygulanan PCR programı.76
Çizelge 3.7. +3 amplifikasyonunda uygulanan PCR programı……....78
Çizelge 3.8. +0, +1 ve +3 amplifikasyonunda kullanılan primerler, adaptörler ve sekansları……78
Çizelge 3.9. +3 amplifikasyonunda kullanılan AFLP primer kombinasyonları ve baz dizilişleri……...79
Çizelge 3.10. % 8'lik Long Ranger solüsyonunun hazırlanışı…….88
Çizelge 3.11. Poliakrilamid jel bileşenleri ve miktarları.....88
Çizelge 3.12. 41 dayanıklı hatta +3 amplifikasyonunda kullanılan AFLP primer kombinasyonları…….…….89
Çizelge 3.13. SSR primerleri ve baz dizilişleri.....……91
Çizelge 4.1. DNA ve DNA bulklarında polimorfizm oluşturan AFLP primer kombinasyonlarının dayanıklı yakın izogenik hatlarda, ebeveynlerde ve F_1 generasyonunda elde edilen sonuçları.……..……176

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	Milli molar
µl	Microlitre
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

Dünya nüfusu çok hızlı bir oranda artmaktadır. Tahminlere göre, 2050 yılında 12 milyar olacak dünya nüfusunun besin ihtiyacını karşılamak için gelecek 50 yıl içerisinde, tarımın başladığı 10000 yıl öncesinden bu güne kadar üretilen gıdanın iki katından daha fazlasına ihtiyaç duyulacaktır (Hoisington et al., 2002). Hiç şüphesiz buğday, bu besin ihtiyacının karşılanmasında ilk sıradaki ürünler arasında yer alacaktır.

Buğdayın kültüre alınması tarih öncesine dayanmaktadır. Kültüre alınan ilk gıda ürünlerinden birisi olan buğday, 8000 yıl boyunca Avrupa, Batı Asya ve Kuzey Afrika'daki önemli medeniyetlerin temel gıda maddesi olmuştur. Günümüzde ise diğer ticari ürünlerden daha çok alanda yetiştirilmekte ve insanlar için en önemli tane besin kaynağı olarak tüketilmektedir (Curtis et al., 2002).

Tarımsal üretimde farklı etmenlerden dolayı oluşan ürün kayıpları yapılan mücadele yöntemlerine rağmen devam etmektedir. Dünya genelinde tüm etmenlerin oluşturduğu verim kayıpları 500 milyar dolar (USD) olarak tahmin edilmektedir (Oerke, 1994; Boyraz ve Delen, 2005). Bitkileri hastalık etmenlerinin oluşturduğu zararlardan korumak için pek çok yöntem kullanılmasına rağmen, kayıplar tehdit edici boyuttadır. Hastalıklardan dolayı ortaya çıkan ürün kayıplarının dünyadaki toplam ürünün % 12'si olduğu sanılmaktadır (Agrios, 1997; Boyraz ve Delen, 2005). Hastalıklar sadece ürün miktarını düşürmezler aynı zamanda ürün kalitesini de olumsuz etkilerler.

Hastalıkların yapmış olduğu zararları önlemek için çoğu zaman

kimyasallar uygulansa da bitki hastalıklarının oluşturacağı zararın tam olarak önlenmesi olası görülmemektedir. Ayrıca kimyasal kullanımı hem ürün maliyetini arttırması hem de çevreye ve diğer canlılara verebileceği olası zararlar nedeniyle her geçen gün kısıtlanmaktadır. Hastalıkların sebep oldukları ürün kayıplarını azaltmak için kimyasal mücadeleye alternatif olarak hastalıklara dayanıklı bitki kullanımına yer verilmelidir (Boyraz ve Delen, 2005).

Çoğunlukla mantar patojenlerinin, virüslerin ve bakterilerin neden olduğu buğday hastalıkları, buğday yetiştirilen hemen hemen bütün alanlarda üretimi oldukça sınırlamaktadır (Singh and Rajaram, 2002). Bunlar arasında paslar, dünyada bilinen en eski bitki hastalıklarındandır. *Puccinia* spp. tarafından meydana getirilen bu hastalıklar, bütün bitki hastalıkları içinde ekonomik yönden birinci sırada yer almaktadır. Günümüzde dayanıklı bitkilerin geliştirilmesi bu hastalıkların kontrolünde en geçerli yöntem olarak kabul edilmektedir (Altay, 1980).

Puccinia recondita Roberge ex Desmaz. f. sp. *tritici* Eriks. & E. Henn'in neden olduğu buğday kahverengi pası, hemen hemen buğdayın yetiştiği her yerde görülmektedir. Buğdayda görülen diğer iki pas hastalığıyla karşılaştırıldığında daha düzenli olarak her yıl ortaya çıkar (Chester, 1946; Samborski, 1985). Buğday kahverengi pas fungusu farklı iklimlere adapte olmuş ve dünyada buğday yetişen farklı alanlarda görülebilmektedir (Roelfs et al., 1992). A.B.D., Kanada, Batı Avrupa, Doğu Rusya, Sibirya, Çin, Güney Amerika, Kuzey Afrika, Hindistan, Japonya, Avustralya ve İskandinavya en yaygın olduğu ülkeler ve bölgelerdir. Türkiye'de ise başta Trakya olmak üzere Ege, Marmara, Karadeniz gibi bütün sahil bölgeleri ile geçit bölgeleri ve Orta

Anadolu'da özellikle sulanır alanlarda etkili olmaktadır (Altay, 1980). Kahverengi pasa duyarlı olan ve kültürü yapılan buğdaylar, ilk pas enfeksiyonunun bitki gelişim safhasında oluşmasına bağlı olarak % 5-15 ya da daha fazla verim kaybına uğramaktadırlar (Samborski, 1985).

Özellikle son 30 otuz yılda pasa dayanıklı kışlık buğday çeşitlerinin yaygın olarak kullanımı kahverengi pasın neden olduğu kayıpları biraz olsun azaltmıştır. Kahverengi pas fungusunun birçok ırkı mevcuttur ve çeşitler bütün ırklara dayanıklı değildir. Her birkaç yılda bir yeni ırklar meydana gelmekte ve daha önceki dayanıklı çeşitler duyarlı hale gelmektedirler. Kahverengi pasa dayanıklı bir çeşidin dayanıklılık süresi genellikle 2 ile 4 yıl arasında değişmektedir. Buğday ıslah programları yeni dayanıklılık genlerinin yeni çeşitlere aktarılmasıyla sürdürülmelidir (Lipps, 2006).

Kahverengi pasın neden olduğu verim kayıplarını azaltmanın en ekonomik ve en tercih edilen yöntemi genetik dayanıklılıktır. Dünya çapındaki çeşitli buğday ıslah programları, kahverengi pasa uzun süreli ve etkili dayanıklılık gösteren çeşitlerin geliştirilmesi için birlikte çalışmaktadırlar (Kolmer, 1996).

Kahverengi pas, buğday yetiştirilen hemen her yerde görülmesine karşılık meydana getirdiği zarar kara ve sarı pasın yaptığı zarar kadar dikkat çekici olmamaktadır. Bu iki pasın meydana gelme zamanları ve bitkide oluşturdukları zarar nedeniyle tane doğrudan etkilenmekte ve verim kaybı büyük görünmektedir. Fakat bu iki pas her yıl etkili olmayıp 7-8 yılda bir ağır epidemi meydana getirmektedirler. Kahverengi pas ise hemen her sene ortaya çıkmakta ve belli bir oranda verim kaybına neden olmaktadır. Etkisi tane kavrulması şeklinde olmayıp doğrudan verim

komponentleri üzerinde görülmektedir (Altay, 1980).

Son yıllarda moleküler markörler, hem hayvan hem de bitki sistemlerinde gerek temel gerekse uygulamalı çalışmalarda kullanılmaktadır. Moleküler markörlerin en geniş kullanım alanlarından birisi; hayvan, bitki, insan ve ekmeklik buğdayda detaylı genetik ve fiziksel kromozom haritalarının oluşturulmasıdır. Bitki sistemlerinde diğer önemli uygulama alanlarından birisi de, ilgilenilen özelliğe bağlı moleküler markörlerden yararlanarak indirekt seleksiyon yapmak ve konvensiyonel bitki ıslahının etkinliğini arttırmaktır. Çünkü bu markörler çevreden etkilenmezler ve bitki gelişiminin her safhasında incelenebilirler. Bunun yanında DNA markörleri germplazm karakterizasyonunda, genetik tanımlamalarda, transformatların karakterizasyonunda, genom organizasyon çalışmalarında, filogenetik analizlerde kullanılmaktadır (Gupta et al., 1999).

Genomunun ploidi düzeyi, büyüklüğü, kompleks yapıda olması, yüksek oranda tekrarlanan sekans içermesi ve de polimorfizm seviyesinin düşük olması nedeniyle diğer bitkilere kıyasla buğdayda moleküler genetik çalışmaları nispeten yavaş ilerlemektedir. Yinede buğdayda haritalama çalışmaları yapılmış ve QTL (Quantitative Trait Loci) çalışmaları devam etmektedir. Ancak buğdayda çok sayıda hastalık ve zararlılara dayanıklılık büyük genler tarafından kontrol edildiği için buğday moleküler çalışmaları bu tür genlerin haritalanması üzerinde yoğunlaşmıştır (Hoisington et al., 2002).

Bitkilerde markörler yardımıyla seleksiyona (MAS) temel oluşturan tarımsal olarak önemli özelliklerin moleküler markörler ile belirlenmesinde ve haritalanmasında büyük ilerlemeler kaydedilmiştir.

Markörler yardımıyla seleksiyon için gerekli moleküler etiketleme farklı moleküler markörler kullanılarak birçok bitki türü için geliştirilmiştir (Mohan et al., 1997).

Genellikle RFLP, AFLP ve polimeraz zincir reaksiyonuna dayanan RAPD, SCAR, STS, SSR ya da diğer bir adıyla mikrosatelit markörleri gibi moleküler markörler, bitki ıslahçılarına buğdayda, hastalığın bulunduğu çevrelerde dayanıklılık genleri için indirekt seleksiyonun uygulanmasında ve dayanıklılık genlerinin piramitleştirilmesinde önemli bir araç sağlamaktadır (Röder et al. 1998b; Gupta et al. 1999).

Özellikle arzu edilen karakterlerin seleksiyonu için RAPD, AFLP, SSR, RFLP, SCAR, STS, ISA ve ALP gibi markör sistemlerini F_2 ve geri melez populasyonları, yakın izogenik hatlar, double haploidler ve rekombinant kendilenmiş hatlarda kullanmak gereklidir (Mohan et al., 1997).

Yakın izogenik hatlar (Nearly Isogenic Lines, NIL) markörlerin belirlenmesinde kullanılan ilk materyallerden birisidir. Yakın izogenik hatların oluşturulması zaman alıcıdır ancak iki yakın izogenik hat arasında DNA seviyesinde belirlenen herhangi bir polimorfizmin, ilgilenilen hedef gen ile sıkı bir linkage durumunda olma olasılığı çok yüksektir. Bu nedenle yakın izogenik hatlar çalışılan gen etrafında moleküler markörleri içeren yüksek yoğunluktaki haritaların geliştirilmesi için değerli bir materyaldir (Masojc, 2002).

Bu çalışmanın amacı; markörler yardımıyla seleksiyonda (MAS) kullanılabilecek kahverengi pas dayanıklılık geni *Lr13*'e ait moleküler markörleri geliştirmektir. Bu amaçla CIMMYT (International Maize and Wheat Improvement Center)'ten temin edilmiş ve her biri farklı bir

kahverengi pas dayanıklılık geni taşıyan 41 adet Thatcher yakın izogenik hattı kullanılmıştır. Ayrıca, duyarlı yerli çeşit İzmir 85 ile *Lr13* genini taşıyan 12 No'lu dayanıklı hat (Tc*6/Frontana) arasında melezleme yapılmış ve bunların F_1 generasyonu çalışmanın materyalini oluşturmuştur. Thatcher yakın izogenik hatlarında, belirtilen ebeveynlerde ve bunların F_1 generasyonunda AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ve SSR (Simple Sequence Repeat) markörleri incelenmiş ve *Lr13* genine ait moleküler markör belirlenmeye çalışılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Buğday (*Triticum aestivum* L.)

Tahıllar dünyada kültürü yapılan bitkiler içersinde en fazla ekim alanına ve üretime sahiptir. İnsan ve hayvanlar tarafından tüketilen yıllık protein miktarının yaklaşık % 50'sini karşılamaktadırlar (Çölkesen, 1995). Tahıllar içersinde buğday, insan beslenmesinde kullanılan kültür bitkileri arasında ekiliş ve üretim bakımından ilk yeri alan bitkidir. Geniş adaptasyon sınırları, tanesinin uygun beslenme değeri, taşıma, saklama ve işlenmesindeki kolaylıklar nedeniyle buğday, çoğu ülkenin temel besini durumundadır ve tüketilen proteinin yaklaşık % 40'ını sağlamaktadır (Kün,1981) .

Buğday dünyada 240 milyon hektardan daha fazla bir alanda yetiştirilmektedir ve dünya ticaretinde en önemli yere sahiptir. 2004 yılında 632 milyon ton olan dünya buğday üretimi, 2005 yılında 627 milyon tona ve son olarak 2006 yılında 617 tona düşmüştür. Yurdumuzda da 9.400.000 ha ekim alanı ile 2004 yılındaki buğday üretimi 21 milyon ton, 2005 yılında 20 milyon ton ve 2006 yılında ise yine 21 milyon ton ile sabitlenmiştir (FAOSTAT, 2007).

Buğday hiç şühesiz insan beslenmesinde kullanılan tahıl ürünlerinin başında yer almaktadır. Bu nedenle de dünya açlık sorunun çözümünde temel tahıl türlerinden biridir.

Buğdaylar arasında en çok bilinen ve yetiştirilen ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.)'dır. Buğday tanesinde, fermantasyon sırasında oluşan CO_2'i hamur içerinde tutarak hamurun kabarmasına neden olan, bir çeşit elastik protein formu gluten bulunmaktadır. Glutenin bu

özelliğinden dolayı buğday ekmek yapımında kullanılmaktadır. Ayrıca buğday unu makarna, bisküvi ve diğer unlu mamüllerin yapımında önemli bir yere sahiptir (Curtis et al., 2002). Buğday tanesi alkollü içeceklerin kaynağıdır ve sentetik kauçuk ve patlayıcı maddelerin yapımında kullanılan endüstriyel alkol de buğday tanesinden elde edilmektedir. Buğday tanesi ve öğütülmesinden sonra elde edilen kepek çiftlik hayvanlarının beslenmesinde önemli bir yere sahiptir. Bunun yanında buğday bitkisinden elde edilen saman hasır, halı, sepet, kağıt yapımında ve paketlemede kullanılmaktadır. Ayrıca buğday geçici mera alanlarını oluşturmak için de yetiştirilmekte ve hayvanlara besleyici ve lezzetli bir besin kaynağı olmaktadır (Duke, 1983). Bu kadar çok kullanım alanına sahip buğdayın adaptasyonunun geniş olması, depolanmasının kolaylığı ve tanelerinin kolaylıkla un haline getirilebilmesi buğdayın önemini daha da arttırmaktadır.

2.2. Buğday Pas Hastalıkları ve Kahverengi Pas

Yerleşik yaşamın başlayıp ilk insanların tarım hayatına geçişleri bakteriyel ve fungal patojenler ile kültür bitkileri arasında yakın bir ilişkinin başlangıcını oluşturmuştur. Bu yakın ilişki bazen hastalık salgınlarının ortaya çıkarak tüm ürünün kullanılmayacak duruma gelmesine ve bunun sonucunda da birçok insanın yaşamını yitirdiği kıtlıkların görülmesine neden olmuştur. Dünya nüfusunun hızla arttığı günümüzde, ürünlerin hastalıktan korunması daha da önemli bir konu haline gelmiştir (Kazan ve Gürel, 2001).

Buğday pas hastalıkları bilinen en eski ve üzerinde en çok çalışılan bitki hastalıkları arasında yer alır. Buğdayda üç çeşit pas hastalığı vardır:

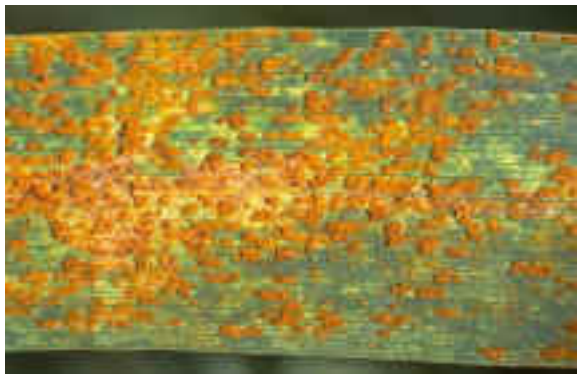
kara pas, kahverengi pas (yaprak pası) ve sarı pas. Bu hastalıkların her birisine pas fungusunun özel türleri sebep olmaktadır. Pas hastalıkları konukçu oldukları bitkilerde benzer semptomlar oluştururlar ve bitkide yapacakları enfeksiyonlar için benzer gereksinimleri vardır (Marsalis and Goldberg, 2006).

Kara pasa *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* fungusu neden olmaktadır. Kara pas özelikle bitkinin saplarında oluşur ancak yaprak, yaprak kınları, kavuzlarda, kılçık ve hatta tohumlarda görülebilir. Oval şeklinde başlayan semptomlar genellikle kırmızımsı kahverengi lezyonlara neden olur. Hastalığın ileriki dönemlerinde patlayan püstüller çok sayıda siyah sporlar oluştururlar. Sapları saran lezyonlar sapların ve sonrasında bitkinin kırılmasına neden olur (Marsalis and Goldberg, 2006). Pas hastalıkları içinde bitkiye en çok zarar yapan hastalıktır. Hastalığın gelişme şartları optimum olduğu durumda bir ayda % 50 verim kayıplarına neden olabilir. Duyarlı çeşitlerde % 100 kayıplar söz konusu olabilir (Roelfs et al., 1992).

Puccinia striiformis fungusunun neden olduğu sarı pas, yaprak ve başaklar üzerinde oluşan çizgiler halindeki açık sarı ve kenarları düz püstüllerle diğer paslardan ayrılmaktadır. Püstüller dar ve değişen uzunluktadırlar. Olgunlaşan püstüller sarı-turuncu renkte sporlar oluştururlar. Hastalığın ilerleyen döneminde püstüller etrafındaki dokular kuruyarak kahverengi bir renk alır ve bu da dokunun kavrulmasına neden olur (Marsalis and Goldberg, 2006). Hastalık bitkiyi erken dönemlerde enfekte ederse bitkinin büyümesi önlenir ve zayıflar. Pörsüyen tanelerden ve zarar gören sürgünlerden dolayı kayıplar çok yüksek (% 50) olabilir.

Sarı pas çok ekstrem durumlarda % 100 kayıplara neden olabilir (Roelfs et al., 1992).

Yaprak pası olarak da bilinen kahverengi pasa *Puccinia recondita* Roberge ex Desmaz. f. sp. *tritici* Eriks. & E. Henn patojeni neden olmaktadır. Kahverengi pas genellikle yaprak üzerinde görülür ancak kavuzlar ve kılçıklar da enfeksiyona uğrayabilirler. Yaprağın üst yüzeyinde, enfekte olmuş dokularda, başlangıçta küçük, yuvarlaktan ovale kadar değişen sarı benekler oluşur. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde bu lekeler portakal rengi püstüllere dönüşür ve bu püstüllerin etrafı sarı bir hale ile çevrilir (Şekil 2.1). Daha sonra bu püstüller etrafa kolayca dağılabilen çok sayıda spor oluşturur. Sporlar, yaprak yüzeyinde ve bulaştığı diğer alet, ekipman ve ellerde portakal rengi bir toz oluşturur. Hastalığın daha da ilerleyen dönemlerinde siyah sporların oluşturulmasıyla, aynı yaprak üzerinde turuncu ve siyah sporların karışımı görülür. Başaklar üzerinde küçük turuncu lezyonlar görülebilir ancak bunlar patlayıp etrafa dağılan püstüller üretmezler. Bu özellik kahverengi pası kara pastan ayırt etmede yardımcı olur (Marsalis and Goldberg, 2006).



Şekil 2.1. Yaprak yüzeyinde kahverengi pas püstülleri.

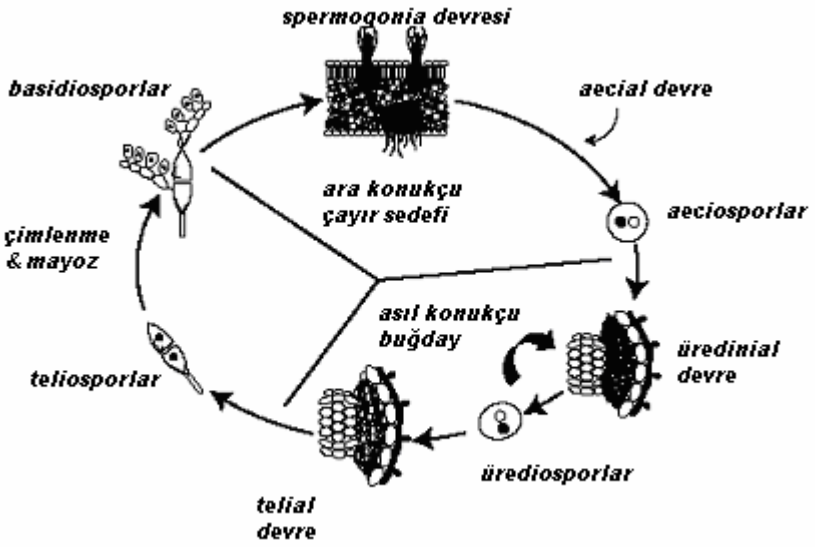
Kahverengi pas buğdayın yetiştirildiği her yerde görülebilir. Kahverengi pasın buğdayda oluşturduğu zarar, pasın gelişim devresi ile ilgili olarak enfeksiyon zamanında buğday gelişim dönemine bağlıdır. Çiçeklenme öncesi veya süresince meydana gelen salgınlar ve özellikle de bayrak yaprağı şiddetli bir enfeksiyona uğradığı zaman ciddi kayıplar söz konusudur (Lipps, 2006). Tane verimindeki kayıplar asıl olarak çiçeklerde oluşan azalmalardan oluşmaktadır. Nem stresi ile birlikte ciddi epidemilerde taneler kurur ve büzüşür. Nadiren bazı genotiplerde çiçekler, sürgünler ve bitki, erken epidemilerde (çiçeklenme öncesi) tamamen ölebilir (Roelfs et al., 1992). Kahverengi pas genellikle yapraklarda oluşturduğu püstüller ile fotosentez alanını kısıtlamaktadır. Ürün kaybı, başaktaki tane sayısının azalmasına, tane boyutunun küçülmesine, 1000 tane ve hektolitre ağırlığının azalması şeklinde olmakta, protein içeriğinin azalması ile de kalite kaybı oluşmaktadır (Arslan vd., 2002; Lipps, 2006). Kahverengi pasın oluşturduğu kayıplar genellikle çok fazla değildir (< % 10) fakat çok büyük kayıplar da (% 30'dan daha fazla) gözlenebilir (Roelfs et al., 1992).

Johnston (1931), Malakof çeşidi ile yaptığı çalışmada kahverengi pasın başak sayısında % 9.11, başaktaki tane sayısında % 39.89, bitkideki tane sayısında % 40, başaktaki tane ağırlığında % 47.5, bitkideki tane ağırlığında % 47.34'lük bir azalma meydana getirdiğini belirtmiştir. Bu komponentlerde meydana gelen azalmaların, verimde % 55.7 oranında bir düşüşe sebep olduğunu vurgulamıştır. Araştırıcı Fulhard çeşidi ile yaptığı araştırmada ise verim kaybının % 22.3 olduğunu bildirmiştir (Altay, 1980).

Arslan vd. (2002), Bursa ili ekolojik koşullarında buğday

kahverengi pasının 10 ekmeklik buğdayda (3 çeşit ve 7 hat) oluşturduğu reaksiyonları ve verim kayıplarını incelemişlerdir. 2000-2001 üretim yılında yaptıkları çalışmada Marmara-86 çeşidinin kahverengi pasa orta duyarlı olduğunu diğer çeşit ve hatların duyarlı olduğunu saptamışlardır. Regresyon analizi sonucunda, hastalık şiddetinin her %1 artışında ortalama kayıpların tane ağırlığında 4.07 kg/da, 1000 tane ağırlığında 0.13 g olduğunu belirlemişlerdir. Hastalık şiddetine bağlı olarak ortalama kayıp tane veriminde 53.1 kg/da (% 9.4), 1000 tane ağırlığında ise 4.3 g (% 9.3) olarak saptanmıştır.

Pas fungusunun kompleks bir yaşam çemberi vardır. Paslar yaşam döngüsünü tamamlamak için iki özel konukçu bitkiye ve 5'e kadar varan farklı spor devresine ihtiyaç duyar (Şekil 2.2). Konukçu bitkilerden birisi ekonomik öneme sahip bitkidir. Diğer konukçu bitki ise yabani otlar ya da doğal bitkilerdir (Marsalis and Goldberg, 2006).



Şekil 2.2. Kahverengi pas fungusunun yaşam çemberi (Marsalis and Goldberg, 2006).

Spermogonia devresinde aynı ismi taşıyan üreme organları oluşur. Bunların içinde pas funguslarının eşey hücreleri meydana gelir. Spermatizasyon olayı sonucu erkek ve dişi organlar birleşir ve pas funguslarında yeni fizyolojik ırkların oluşması bu olay sonucudur. Aecia devresinde konukçu dokuda aeciosporları oluşur ve etraflarında sarılı zarın patlaması sonucu doğaya yayılırlar. Uredia devresinde ise doğaya dağılan aeciosporlar yeni konukçuları enfekte ederler. Konukçu içerisinde uredium denilen organlar oluşur ve bu organların oluşturduğu sporlara da uredospor adı verilir. Konukçu epidermisinin yırtılmasıyla serbest kalarak doğaya yayılan bu sporlar, pas fungusunun üremesinde ve büyük alanlarda salgınların oluşmasında önemlidirler. Bunlar ilkbahar sonundan yaz sonuna kadar sürekli oluşarak devamlı hastalığı yayarlar. Yaz mevsimi boyunca devam eden uredospor enfeksiyonları sonbahara doğru azalır ve uredia yatakları teliospor oluşturmaya başlarlar. Mevsim sonunda bu yataklarda sadece teliosporlar bulunur. Kışı yere düşmüş bitki artıkları üzerinde geçiren ilkbaharda olgun teliosporlar içinde karyogami meydana gelir. Yani o zamana kadar çift çekirdekli olan teliospor içinde çekirdekler birleşir. Daha sonra teliospor çimlenerek bir basidim oluşturur. Basidim içinde arka arkaya yer alan mayoz ve mitoz bölünmeler ile oluşan 4 adet çekirdek, basidimin yanında oluşan basidiosporlara geçerler. Bunlar doğaya yayılarak pas devrelerinin ilk aşamasını meydana getirmek için konukçuyu enfekte ederler (Nemli, 2000).

Kahverengi pas fungusu güzlük ekimleri uredosporlarıyla enfekte etmekte veya yaz ortasında öz çimenleri enfekte ederek bunlarla birlikte kışı misel halinde geçirmektedir. Hatta bazı koşullarda fungusun

uredospor halinde de kışlaması olasıdır. İlkbaharda bu kaynaklardan yayılan fungus ilk enfeksiyonlarını yaparak uredosporlarını oluşturur. Ancak bazı bölgelerde fungusun yaşamına ara konukçu da girebilmektedir. Burada iki cinse ait bitkiler olan Tbalictrum (Çayır Sedefi) ve Isopyrum (Şeytan Minaresi) fungusun ara konukçularıdır. Bu bitkiler üzerinde basidiosporların enfeksiyonu sonucu aeciosporlar oluşur, bunların havada uçuşmaları ile de buğday bitkilerinin enfeksiyonu gerçekleşir (Nemli, 2000).

Arasıra yağan yağmurlardan yaprak yüzeyinde kalan sular veya ağır çiğler ve sıcaklık patojenlerin çimlenmesi ve büyümesi için hastalık gelişiminde gereklidir. Kahverengi pas fungusu optimal olarak 15 ile 22 °C sıcaklıkları arasında gelişir, sıcaklık 27 °C'nin üzerine çıkıncaya kadar hastalığın ilerlemesi devam edecektir. Hastalık gelişimi için şartlar optimum olduğunda enfeksiyon 6-8 saat sürer ve hastalığın yayılmasına neden olan uredosporların oluşması 7-10 gün sürer (Marsalis and Goldberg, 2006).

2.3. Buğdayda Kahverengi Pas Dayanıklılığı

Bir organizmanın parazit olabilmesi için konukçuda yaşayabilmesi ve orada çoğalabilmesi gerekir. Bu parazit konukçuya zarar verir ve hastalık meydana getirebiliyorsa o zaman patojen olarak adlandırılır. Buradan anlaşılacağı gibi patojenin mutlaka bir parazit olması gerekirken, parazitin patojen olması gerekmez (Crute, 1986; Tör, 1998). Ancak patojen tanımının bu şekilde sınırlı tutulması bazı yanlış anlaşılmalara ve tartışmalara neden olmaktadır. Çünkü bir etmen belirli çevre koşullarında bir bitkinin patojeni olurken farklı bir çevrede aynı

bitkiye zarar verememektedir (Tör, 1998).

Bir patojenin normal yaşamını sürdürdüğü konukçu bitki hassas (duyarlı), patojen de virülent olarak adlandırılır. Konukçu–patojen arasındaki ilişki de uyumlu olarak tarif edilir. Bununla birlikte, patojen bitkide herhangi bir zarar oluşturmuyor, normal yaşamını devam ettiriyor ve bitkiyi istila ederek çoğalmasını devam ettiriyorsa bu bitki bu patojene toleranttır. Ancak, bitki patojenin gelişme ve çoğalmasını çeşitli nedenlerle tamamıyla durduruyor ise bu bitki dayanıklı, patojen de avirülent olarak adlandırılmaktadır. Dayanıklı bitki ile patojen arasındaki ilişki de uyumsuz olarak kabul edilir (Crute, 1986; Ellingboe, 1984; Bennetzen and Jones, 1992; Lindsay et al., 1993; Tör, 1998).

Kahverengi pasa dayanıklılığı arttırmak için iki temel ıslah stratejisi vardır; bunlardan birincisi tam dayanıklılık sağlayan büyük dayanıklılık genlerinin (*Lr* genleri) piramidleştirilmesi, ikincisi ise kantitatif dayanıklılık gösteren küçük genlerin bir araya getirilmesidir. Ancak tek bir gen tarafından sağlanan dayanıklılık çok kısa zaman periyotlarında patojen populasyonunda virülent ırkların ortaya çıkmasıyla yok olmaktadır. Daha uzun süreli dayanıklılığı elde etmek için kısmi dayanıklılık veya yavaş paslanma dayanıklılığı (slow rusting resistance) olarak adlandırılan kantitatif dayanıklılık tercih edilmelidir. Çünkü kantitatif dayanıklılıkta pas enfeksiyonu tamamen engellenmez sadece hastalığın yayılması önlenir (Messmer et al., 2000).

Buğday çeşitlerinin *P. recondita* f. sp. *tritici'a* dayanıklılıkları yeterli değildir. Çünkü dayanıklılık gen kaynakları ıslahçılar tarafından uzun süre kullanılmaktadır, ki bu da yeni virülent patojenlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Büyük zarar yapan patojenlere yeni

dayanıklılık kaynaklarının bulunması gerekir. (Wisniewska et al., 2003).

Son on yıl boyunca buğdayda saptanan ve haritalanan *Lr* (Leaf rust) dayanıklılık genlerinin sayısı önemli derecede artmıştır (McIntosh et al., 1998; Chelkowski and Stepien, 2001). Buğday genomu (hücre başına 17.3 pg) bitki türleri arasında en büyük genoma sahiptir ve haploid çekirdekte 17.000 Mbp'dir (Arumuganathan and Earle, 1991; Chelkowski and Stepien, 2001). Genomun büyüklüğü kadar kodlanmayan sekans oranının (% 90'nın üzerinde) da yüksek olması ve 7 homolog kromozomla 3 farklı genoma (A, B ve D) sahip olması, buğday dayanıklılık genlerinin moleküler olarak saptanmasını ve klonlanmasını güçleştirmektedir. Hexaploid buğdaydaki 42 kromozomdan her birisinin ortalama boyutu yaklaşık 800 Mbp'dir. Crossing-over (=1 cM)'lar arasındaki fiziksel uzaklık 0.3 ile 3 Mbp arasında değişiklik gösterir (Feuillet et al., 1995; Chelkowski and Stepien, 2001). Buğdayın akraba yabani türleri genellikle buğdayla ortak bir genom içerir. Bu nedenle yabani buğdaylar yeni dayanıklılık genlerinin araştırılması ve haritalanması için önemli bir kaynak oluşturur. Çünkü buğdayın akraba türlerinden bazıları farklı genom taşırlar (*Triticum* sp., B genomu; *Aegilops speltoides*, B genomuna benzeyen S genomu; *Triticum boeoticum*, A genomu; ve *Aegilops squarrosa*, D genomu) ve bu türler ıslahta hala önemli dayanıklılık kaynağı olarak kullanılmaktadır. Yabani bir türden ilgilenilen geni taşıyan kromozom fragmentinin buğday hattına translokasyonu en çok kullanılan yöntemdir. DNA düzeyinde geliştirilmiş yeni yöntemlerle incelenen gene bağlı moleküler markörlerin dizaynı yapılabilmektedir (Chelkowski and Stepien, 2001).

Buğdayda kahverengi pasa dayanıklılık genlerinin çoğu bitki

gelişiminin bütün devrelerinde etkindir. Bu genler bitkiler fide döneminde iken de dayanıklılık sağlarlar ve fide dönemi dayanıklılık genleri olarak kabul edilir. Ancak bazı dayanıklılık genlerinin etkisi bitkiler fide dönemini geçirdikten sonra ilerleyen dönemlerde, ergin bitkilerde görülür ve bu genler de ergin dönem dayanıklılık genleri olarak anılır. Bu genler sadece avirülent patojenlere dayanıklılık sağlarlar. Ergin dönem dayanıklılık genleri ya tek bir gen ya da birden fazla gen ile idare edilirler (Park and McIntosh, 1994).

Kolmer (2003), 35 adet yumuşak taneli kışlık buğday (*T. aestivum* L.) çeşidi ve 17 adet ıslah hattında kahverengi pas fide dönemi dayanıklılığını belirlemek amacıyla 16 *P. triticina* izolatını kullanmıştır. İnokülasyon sonucunda çeşitlerin ve hatların reaksiyonlarını tek dayanıklılık geni bakımından farklılık gösteren Thatcher yakın izogenik hatlarının vermiş olduğu reaksiyonlarla karşılaştırmıştır. Kullandığı çeşit ve hatlarda fide dönemi dayanıklılık genleri *Lr1, 2a, 9, 10, 11, 18* ve *26*'nın bulunduğunu belirten araştırıcı çeşitlerde ve hatlarda ergin dönem dayanıklılığını 2 farklı lokasyonda tarla parsellerinde incelemiştir. Tarla denemelerinde incelediği çeşitlerde ergin dönem dayanıklılık genleri *Lr12* ve *Lr34*'ün etkili olduğunu belirtmiştir. Fide dönemi dayanıklılık genleri *Lr2a, Lr9* ve *Lr26*'nın yanında ergin dönem dayanıklılık genlerini taşıyan çeşit ve hatların yüksek derecede dayanıklılık gösterdiklerini saptamıştır. *Lr1, 10, 11* ve *18* genleri ile ergin dönem dayanıklılık genlerinin kombinasyonu orta veya düşük derecede dayanıklılık göstermiştir.

Kaur et al., (2000), 12 farklı ülkeden 111 ekmeklik buğday çeşidinde Hindistan kahverengi pas ırkı ve bunun yüksek seviyede

virülent 5 varyantına karşı ergin dönem dayanıklılığını incelemişlerdir. Bu çeşitlerden 16'sında görülen ergin dönem dayanıklılığı, çok hassas fide dönemi dayanıklılığı veya ergin dönem dayanıklılık genlerinden kaynaklanmıştır. 45 çeşit, bayrak yapraklarının uç kısımlarında nekrozlar göstermiş ve bu da *Lr34* geni ile linkage gösteren bir özellik olduğu için bu çeşitlerde *Lr34* geninin dayanıklılık sağladığını belirtmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlardan diğer çeşitlerin 6-7 adet çok hassas ergin dönem ve 3 adet de fide dönemi dayanıklılık geni taşıdıklarını saptamışlar ve 111 çeşidi 3 farklı dayanıklılık grubu içinde toplamışlardır.

Ergin dönem bitki dayanıklılığı oligenik veya poligenik kontrol altındadır. Aşırı duyarlılık gösteren tek genlerle (Örneğin *Lr12, Lr13, Lr22b*) idare edilen ergin dönem bitki dayanıklılık örnekleri bilinmektedir (Liatukas, 2003).

Kısmi dayanıklılık orta dayanıklılığın bir şeklidir ve aşırı duyarlılık reaksiyonu kısmi dayanıklılıkta oluşmaz. Kısmi dayanıklılık patojen populasyonunda virülent genotiplerin gelişmesine izin vermez. Sürekli dayanıklılığı sağlamak için ırka spesifik dayanıklılık genlerinin piramitleştirilmesi, fide dönemi dayanıklılık genleri ile ergin dönem dayanıklılık genlerinin kombinasyonu ve ırka spesifik etkili genler ile yüksek seviyede kısmi dayanıklılık sağlayan genlerin bir araya getirilmesi gereklidir (Liatukas, 2003).

Uzak akrabalarını ve progenitör türlerini kapsayan buğdayın yakın türleri yararlı varyabilitenin büyük bir deposudur. Bu varyabilitenin içinde buğdayın geliştirilmesi için kullanılan pas dayanıklılığı da vardır. Yararlı yabancı genleri taşıyan çok sayıda transfer oluşturulmuştur ancak bunlardan birkaç tanesi ticari olarak kullanılmaktadır. Buğdaya aktarılan

bu yabancı segmentlerin çoğu ya buğday kromatin hasarlarını karşılamamakta ya da bitki performansı ve verimde depresyona neden olan arzu edilmeyen genleri içermektedir. Bu olumsuz etkiler, çok küçük miktarda istenmeyen yabancı kromatinle birlikte arzu edilen genlerin transfer edilmesiyle önlenebilir (Liatukas, 2003).

Önemli sayıda *Lr* dayanıklılık genleri kültürü yapılan *T. aestivum*'dan orijinini almaktadır ancak bazı dayanıklılık genleri buğdayın yabani türlerinden aktarılmıştır: *Aegilops umbellulata – Lr9*, *Aegilops squarrosa – Lr21, Lr22, Lr32, Lr39, Lr40, Lr41, Lr42, Lr43*, *Agropyron elongatum – Lr19, Lr24, Lr29*, *Aegilops speltoides – Lr28*, *Lr35, Lr36, Lr47* ve *Aegilops ventricosa – Lr37*. Bazı dayanıklılık genleri (*Lr1, Lr3, Lr11, Lr14, Lr16* ve *Lr26*) Polonya buğday çeşitlerinde saptanmıştır. Ancak bu genlerin dayanıklılığı kimi zaman tek bir gen tarafından sağlanmaktadır ki bu da buğday çeşitlerinde hastalık enfeksiyonunu önemli bir şekilde engellememektedir (Chelkowski and Stepien, 2001).

Hussien et al., (1998) *T. monococcum*'dan ekmeklik buğdaya aktarılan 3 yeni kahverengi pas dayanıklılık geninin kromozom lokasyonlarını belirlemek için monosomik analizi kullanmışlardır. 3 farklı germplazm buğday hattına aktarılan dayanıklılık genlerinin birbirleriyle linkage durumunda olmadığını saptamışlardır. Bu 3 hattı 7 farklı monosomik hatla melezlemişler ve monosomik analizle dayanıklılık genlerinin 6A, 1A ve 5A kromozomlarında yer aldığını tespit etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar bu 3 dayanıklılık geninin birbirinden ve daha önceki çalışmalarda saptanan *Lr* genlerinden farklı olduğunu göstermiştir.

Kahverengi pas dayanıklılığında yüksek inokülant yoğunluğu ve enfeksiyon için uygun çevre şartlarının oluşmasından dolayı meydana gelen hastalık enfeksiyonunda dayanıklılık devreye girer (Roelfs et al., 1992; Seyfarth, 2000b). Başaklanma süresince kahverengi pas fungusu saldırısı başakçık sayısının azalmasından, fotosentez oranının düşmesinden, respirasyon oranının artmasından ve enfekte olmuş dokulardan fotosentez ürünlerinin translokasyonunda oluşan aksaklıklardan dolayı ciddi tane verimi kayıplarına neden olur (Roelfs et al., 1992; Agrios, 1997; Seyfarth, 2000b). Bu nedenle bitki ıslahında ergin dönem bitki dayanıklılığı çok önemlidir. Günümüze kadar çok sayıda kahverengi pas dayanıklılık geni saptanmıştır aynı şekilde kahverengi pasa bağlı kantitatif özellik lokusları da belirlenmiştir. Büyük dayanıklılık genleri Mendel kalıtımı gösterirler. Bu büyük dayanıklılık genlerinin çoğunluğu ya fide döneminde ya da bitkinin tüm yaşamı boyunca dayanıklılık sağlarlar. Ancak bu büyük dayanıklılık genlerinden birkaçı örneğin *Lr12, Lr13, Lr22a, Lr22b, Lr34, Lr35* ve *Lr37* sadece bitkilerin ergin dönemlerinde etkilidirler (McIntosh et al., 1995; Seyfarth, 2000b).

Günümüze kadar belirlenen kahverengi pas dayanıklılık genleri arasında, büyük olasılıkla *Lr13* dünya çapında en çok dağılan gendir (McIntosh et al., 1995; Seyfarth et al., 2000a). Örnegin CIMMYT (International Maize and Wheat Improvement Center) buğday varyetelerinin büyük bir kısmı *Lr13* genini taşımaktadırlar (Rajaram et al., 1988; Seyfarth et al., 2000a). Normal şartlar altında bu dayanıklılık geni, ergin dönem dayanıklılığının karakteristiği olan ergin bitki döneminde dayanıklılık sağlamaktadır. Tek bir gen olarak *Lr13* çoğu

buğday yetişen alanda artık etkili değildir (McIntosh et al., 1995; Seyfarth et al., 2000a). Fakat, *Lr13*'ün *Lr34* ile kombinasyonu kahverengi pasa karşı sürekli bir dayanıklılığın temelini oluşturmuştur (Ezzahiri and Roelfs, 1989; Seyfarth et al., 2000a). Ayrıca *Lr13* ile *Lr16*'nın kombinasyonu da kahverengi pasa artan bir dayanıklılık sağlamıştır (Samborski and Dyck, 1982; Seyfarth et al., 2000a).

Park and McIntosh (1994), ergin dönem dayanıklılık genleri *Lr12*, *Lr13* ve *Lr22b* için serada ergin bitkilerde yaptıkları testlerle Avustralya *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* populasyonlarının virülent olduğunu teyit etmişlerdir. *Lr34, Lr35* ve *Lr37* genlerinin de etkinliklerini inceleyen araştırmacılar bu 6 dayanıklılık geninin ergin dönem bitki dayanıklılık genleri olduğunu saptamışlar ve bitki gelişiminin erken dönemlerinde göstermiş oldukları dayanıklılıklarına göre 4 grup altında toplamışlardır. Ekimden 2 hafta sonra yapılan inokülasyonla bitki fide yapraklarında *Lr13* geninin dayanıklılığı gözlenmiştir. Ekimden 3 hafta sonra yapılan inokülasyonla *Lr37*'nin, 5 hafta sonra yapılanla *Lr12, Lr22a* ve *Lr35* genlerinin, 9 hafta sonra yapılan inokülasyon sonucu da *Lr22b*'nin dayanıklılık gösterdiğini saptamışlardır.

Winzeler et al., (2000) 10 Avrupa ülkesinden 72 buğday çeşidi ve ıslah hattının kahverengi pasa karşı dayanıklılığını iki yıl boyunca tarla koşullarında test etmişlerdir. Fide dönemi dayanıklılığını da inceleyen araştırmacılar 9 hattın bütün lokasyonlarda oldukça dayanıklı olduklarını ve bu hatların ıslah programlarında önemli dayanıklılık kaynağı olabileceklerini vurgulamışlardır. Birkaç hattın ergin dönem dayanıklılığı ya da kısmi dayanıklılık sağladığını tespit etmişler ve *Lr13* genini taşıyan dayanıklı çeşidin farklı bir dayanıklılık tepkisi gösterdiğini, diğer

genlerle kombinasyonu olmaksızın sadece bu genin dayanıklılığının Avrupa'da yeterli olmadığını belirtmişlerdir. *Lr37* geninin ise üstün bir dayanıklılık sergilediğini ancak fide döneminde söz konusu genin etkili olmadığını saptamışlardır. Fide dönemi dayanıklılığının çoğunlukla *Lr1, Lr3a, Lr3ka, Lr10, Lr14a, Lr17b, Lr20* ve *Lr26* genlerinde görüldüğünü tespit etmişlerdir.

Singh et al., (2001) kahverengi pasa ergin dönem dayanıklılığının kalıtımını incelemek amacıyla sera ve tarla koşullarında 6 buğday varyetesinde ve bunlar arasında yapılan melezlerin F_2 ve F_3 populasyonlarında pas inokülasyonu yapmışlardır. Suneca çeşidinde fide dönemi dayanıklılığının *Lr1* ve *Lr13* genleri tarafından idare edildiğini saptayan araştırıcılar yaptıkları allelizm testiyle de Avocet R, Hereward, Moulin ve Pastiche çeşitlerinde fide dayanıklılığının *Lr13* tarafından sağlandığını teyit etmişlerdir. Hereward çeşidinde ergin dönem dayanıklılığı kalıtımının monogenik olduğunu ancak Moulin ve Pastiche çeşitlerinin her birinin 2 dominant gen taşıdıklarını belirtmişlerdir.

Günümüzde kahverengi pasa dayanıklılık sağlayan 50'nin üstünde farklı gen bilinmektedir (McIntosh et al., 2003). Bazı *Lr* dayanıklılık genlerine (*Lr1, Lr9, Lr10, Lr13, Lr19, Lr23, Lr24, Lr25, Lr27, Lr28, Lr29, Lr31, Lr34, Lr35, Lr37* ve *Lr47*) ait markörlerin geliştirilmesinde RFLP ve RAPD stratejileri başarılı bir şekilde uygulanmaktadır (Chelkowski and Stepien, 2001). RFLP markörleri güvenilir sonuçlar verir fakat bu markör sistemi pahalıdır, yoğun çalışma gerektirir ve çok saf DNA ile çalışmak gerekir. Bu nedenlerden dolayı markörler yardımıyla seleksiyonda kullanışlı değildirler (Chelkowski and Stepien, 2001). Markörlerin daha etkili bir şekilde belirlenmesi ve pratik olarak

kullanılması amacıyla, RFLP ve RAPD markörlerinden STS, SCAR ve CAPS stratejileri geliştirilmiştir (Autrique et al., 1995; Prins et al., 1996; Blaszczyk et al., 2004a).

2.4. Moleküler Markörler

Konvensiyonel tahıl ıslahı zaman alıcıdır ve çevresel şartlara çok bağlıdır. Yeni bir çeşidin ıslahı sekiz ile on iki yıl arasında bir süre alır ve hatta bu geliştirilen çeşidin piyasaya çıkarılması garanti edilemeyebilir. Bu nedenle ıslahçılar bu prosedürü daha etkili bir şekilde yapabilecek yeni yöntemlerle ilgilenmişlerdir. Moleküler markör teknolojisi tahıl ıslahında seleksiyon stratejilerini geliştirmek için geniş kapsamlı yeni uygulamaların benimsenmesini sağlamıştır (Korzun, 2002a).

Genetik analizler için moleküler tekniklerin geliştirilmesi tahıl genetiğine dair daha çok bilgi edinilmesine ve tahıl genomunun yapısının ve davranışının anlaşılmasına neden olmuştur. Bu moleküler teknikler özellikle de moleküler markörlerin kullanımı türler arasında veya içinde DNA sekans varyasyonunu gözlemek, buğdayın diğer yabani ve akraba buğdaygil türlerinden yeni, arzu edilen özelliklerin aktarılmasıyla yeni genetik varyasyon kaynaklarını oluşturmak için kullanılmıştır. Son yıllarda markör belirleme sistem ve tekniklerindeki gelişmeler yararlı özelliklere bağlı markörleri saptamak için kullanılmıştır. Bu özelliklere ait markörlerin saptanması tam bir linkage haritası ve bulk segregant analizine dayalıdır. Kısmi haritaların yapılması, pedigrilerin kombinasyonu ve markör bilgisi gibi alternatif metodların da markör/özellik ilişkisini saptamada yararlı olduğu ispatlanmıştır (Korzun, 2002b).

Üç temel genetik markör tipi vardır: bunlardan birincisi morfolojik markörlerdir (klasik ya da görülebilir markörler) ki bunlar fenotipik özellikler ya da karakterlerdir. İkincisi biyokimyasal markörlerdir, bunlar enzimlerin allelik değişkenleridir ve izoenzimler olarak adlandırılırlar. Üçüncü markör sistemi moleküler ya da DNA markörleridir. Moleküler markörler DNA üzerindeki varyasyonları gösterir (Jones et al, 1997). Morfolojik markörler genellikle çiçek rengi, tohum biçimi gibi görülebilir fenotipik karakterlerdir. İzoenzim markörleri, elektroforez işlemiyle ve spesifik boyamayla belirlenmektedir. İzoenzim ve morfolojik markörlerin sayılarının az olması, çevre faktörlerinden ve bitki gelişim evrelerinden etkilenmeleri bunların en önemli dezavantajlarıdır (Collard et al., 2005).

DNA markörleri, genel olarak sayılarının çok olmasından dolayı en yaygın kullanılan markör tipidir. Bu markörler, DNA'da oluşan nokta mutasyonları, insersiyonlar, delesyonlar veya tekrarlanan DNA'nın replikasyonunda oluşan hatalardan meydana gelmektedirler (Paterson, 1996; Collard et al., 2005). Bu markörler nötraldirler çünkü genellikle DNA'nın kodlanmayan kısımlarında oluşurlar. Morfolojik ve biyokimyasal markörlerin tersine, DNA markörleri sınırlı sayıda değildirler, çevresel ve/veya bitki gelişim evrelerinden etkilenmezler (Collard et al., 2005).

DNA markörleri bunların belirlenmesinde kullanılan yöntemler temelinde 3 ana gruba ayrılabilir: (1) hibridizasyona dayalı markörler; RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ve oligonükleotid parmak izlerinin çıkarılması, (2) polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı markörler; RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SCAR

(Sequence Characterized Amplified Regions), SSR (Simple Sequence Repeat), STS (Sequence-Tagged Site), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ISA (Inter-Simple Sequence Repeat Amplification), CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), ALP (Amplicon Length Polymorphism) markörleri, (3) DNA sekanslamasına dayalı yöntemler; SNP (Single Nucleotide Polymorphism) markörleri örnek olarak verilebilir. (Jones et al., 1997; Gupta et al., 1999).

Yukarıda belirtilen 3 grup markör sistemlerinin dışında MP-PCR (Microsatellite Primed Polymerase Chain Reaction), AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction), AS-PCR (Allele Specific Polymerase Chain Reaction), DAF (DNA Amplification Fingerprinting) stratejileri de polimorfizmin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Gupta et al., 1999).

Tahıllarda bu markör sistemlerinden özellikle RFLP, AFLP, RAPD, SSR, STS ve SNP teknikleri kullanılmakta ve yeni markör sistemleri de geliştirilmeye devam edilmektedir (Korzun, 2002a). Bazı özellikler bakımından bu markörlerin karşılaştırılması Çizelge 2.1'de verilmiştir.

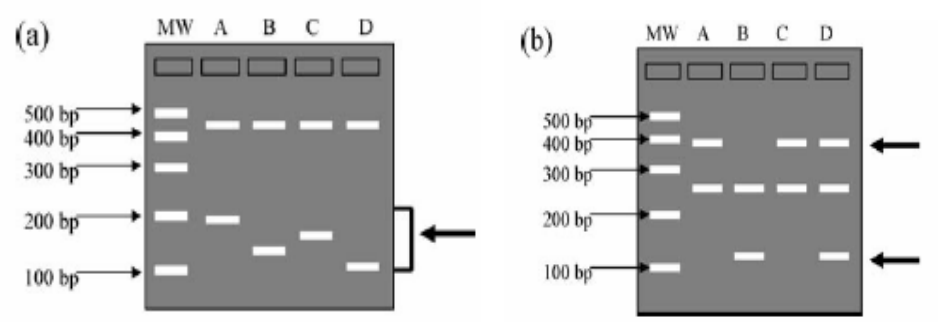
Çizelge 2.1. Tahıllarda sıkça kullanılan DNA markörlerinin karşılaştırılması (Korzun, 2002a).

Özellikler	RFLP	RAPD	AFLP	SSR	SNP
DNA miktarı(µg)	10	0.02	0.5-1.0	0.05	0.05
DNA kalitesi	yüksek	yüksek	orta	orta	yüksek
PCR'a dayalı	hayır	evet	evet	evet	evet
Analiz edilen polimorfik lokus sayısı	1.0-3.0	1.5-50	20-100	1.0-3.0	1
Kullanım kolaylığı	zor	kolay	kolay	kolay	kolay
Otomasyona uyumluluğu	düşük	orta	orta	yüksek	yüksek
Tekrarlanabilirliği	yüksek	güvenilmez	yüksek	yüksek	yüksek
Geliştirme maliyeti	düşük	düşük	orta	yüksek	yüksek
Analiz maliyeti	yüksek	düşük	orta	düşük	düşük

Çizelge 2.1 incelendiğinde; polimorfizmi belirlemede RFLP, SSR ve AFLP markörlerinin çok etkili oldukları görülmektedir. Fakat RFLP için yüksek miktarda DNA gerekmektedir ve analizi için otomasyona çok uygun değildir. AFLP ve SSR markörleri tahıllarda çok popüler markör tipleridir. Tahıllarda yakın gelecekte, yükselen miktarda sekans bilgisi ve gen fonksiyonunun belirlenmesi SNP gibi yeni markör sistemlerinin kullanılmasını gerektirecektir (Korzun, 2002a).

Aynı veya farklı türlerin bireyleri arasında farklılık gösteren markörler polimorfik markörler olarak isimlendirilirler ve bunlar daha yararlıdırlar. Ancak genotipler arasında farklılık göstermeyen markörler

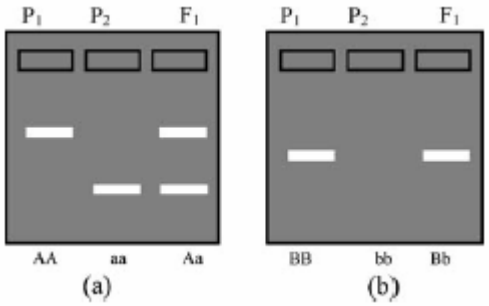
monomorfik markörler olarak bilinirler. Polimorfik markörler ayrıca homozigot ve heterozigotlar arasında ayrımlanabilmelerine göre dominant veya kodominant özellik gösterirler. Dominant markörler var veya yok olarak belirlenirken, kodominant markörler boyut olarak farklılık gösterirler. Kurallara bakılırsa, bir DNA markörünün farklı formları (örneğin jel üzerinde farklı boyuttaki bantlar) markör allelleri olarak adlandırılırlar. Bu durumda kodominant markörler farklı birçok allele sahip olabilirler fakat dominant bir markör sadece 2 allele sahiptir (Collard et al., 2005) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Genotipler arasında kodominant ve dominant DNA markörleri (Collard et al., 2005).

Şekil 2.3'de A, B, C ve D bireyleri arasında polimorfik markörler oklarla gösterilmiştir. Bireyler arasında farklılık göstermeyenler monomorfik markörlerdir. (a) şablonunda SSR markörleri gösterilmiştir. Buradaki polimorfik markör, tek bir genetik lokusda 4 genotipin farklı boyuttaki markör allellerini göstermektedir. (b) şablonunda RAPD tekniğiyle elde edilmiş bantlar görülmektedir. Bu markörler var veya yok olarak değerlendirilirler. Bu markörlerin boyutları moleküler ağırlıktan

(Molecular Weight=MW) hesaplanır. Buradaki her iki markörde de sadece 2 farklı markör alleli vardır (Collard et al., 2005).



Şekil 2.4. Dominant ve kodominant markörlerin karşılaştırılması (Collard et al., 2005).

Şekil 2.4'de kodominant markörlerle (a) heterozigot ve homozigotlar arasındaki farklılık açık bir şekilde görülebilmektedir. Ancak dominant markörler (b) bu ayrımı yapamamaktadır (Collard et al., 2005).

Genetik markörler organizmanın ya da türün bireyleri arasında farklılıklar gösterirler. Genellikle doğrudan hedef geni göstermezler fakat hedef gen için işaret veya etiket görevi yaparlar. Genlere çok yakın yer alan (sıkıca linkage durumunda olan) genetik markörler gen etiketleri olarak bilinirler. Bu tür markörler ilgilenilen özelliğin fenotipini etkilemezler çünkü bunlar sadece, özelliği kontrol eden genlere yakın mesafede lokalize olmuşlardır veya bu genlerle linkage durumundadırlar. Bütün genetik markörler, kromozomlarda 'lokus' olarak adlandırılan spesifik genomik pozisyonlarlarda (genler gibi) yer alırlar (Collard et al., 2005).

Nükleik asit dizilerindeki polimorfizmlere dayalı moleküler (DNA) markörler bitki genom analizlerine dayanan birçok problemin çözümünde kullanılmaktadır; örneğin genetik haritaların oluşturulmasında, basit özelliklerin haritalanmasında, kantitatif özellik lokuslarının (QTL, Quantitative Trait Loci) haritalanmasında, mutasyonların haritalanmasında, transgeniklerin saptanmasında, bitki ıslahında genetik tanımlamalarda, populasyon genetiğinde, moleküler taksonomi ve evrimde, bireylerin saptanmasında, germplazm karakterizasyonunda, tescilli germplazmların belirlenmesinde ve genom büyüklüğünün ölçülmesinde kullanılmaktadır (Rafalski et al., 1996; Seyfarth, 2000b).

Agronomik öneme sahip hedef bir gene, linkage durumunda bulunan bir moleküler markörü saptamak için 4 temel strateji vardır. Bunlardan birincisi yakın izogenik hatları (Near Isogenic Lines, NILs) kullanmaktır. Yakın izogenik hatlar sadece, ilgilenilen gendeki ve komşu kromozomal bölgedeki allel grupları bakımından farklıdırlar. İkinci strateji, tek bir gene bağlı moleküler markörleri belirlemede Bulk Segregant Analizini (BSA) kullanmaktır. Üçüncü satratejide ise, kantitatif özellik lokuslarını ve bunların markörlerini saptamak amacıyla çok kompleks özellikleri genetik olarak ayrıntılı şekilde incelemek gerekir. Son olarak dördüncü stratejide, bilgisayar veri tabanları (sekanslama ve haritalama verileri) devreye girer (Masojc, 2002).

Bitki ıslahındaki temel faaliyetlerden birisi, çeşitli çevrelerde biyotik ve abiyotik streslere dayanıklılık sağlayan değerli gen kaynaklarını araştırmaktır. Bu kaynaklar genellikle hatlar, türler, kültürü yapılan çeşitler ve hatta bunların yabani akrabalarıdır. Verim kapasitesini düşüren genler gibi arzu edilmeyen genleri taşıdıklarından genellikle

bunları ıslah programlarına dahil etmek zordur. Dayanıklılık allellerini kültürü yapılan çeşitlere aktarmak için verici hat ile alıcı çeşit arasında F_1 hibridini elde etmek gerekir. Daha sonra tekrarlanan ebeveyn olarak alıcı ebeveyn ile 6 kez geriye melezleme ve her geriye melezlemeden sonra dayanıklılık için pozitif seleksiyon ve verici ebeveynin istenmeyen özellikleri için negatif seleksiyon yapılır. Fenotipik değerlendirmeye dayanan, direkt olarak yapılan bu seleksiyonun etkinliği şu durumlarda çok düşük olabilir: 1) ilgilenilen özellik dış çevresel faktörlerle değişebilir (düşük kalıtımlı) ise, 2) bu özellik dominant veya birden fazla gen tarafından idare ediliyor ise, 3) söz konusu özelliğin değerlendirilmesinde kullanılan metot pahalı, zahmetli ve büyük ölçekli seleksiyon için elverişsiz ise. Belirtilen bu koşulların herhangi birinde dikkate alınması gereken bir seçenek de genotiplerin saptanmasına dayalı bir moleküler markör metodunun geliştirilmesidir, ki bu da indirekt seleksiyon ya da markörler yardımıyla seleksiyona (Marker Assisted Selection, MAS) olanak verecektir (Masojc, 2002).

Markörlerin saptanmasında yakın izogenik hatlar ve F_2 populasyonları önceden hazırlanıp, uygun hale getirilip kullanılan ilk materyaldir. Ancak yakın izogenik hatların oluşturulması uzun süre almaktadır. Yakın izogenik hatların hemen hemen bütün genleri aynıdır fakat ilgilenilen özelliği kodlayan lokusun allelik kompozisyonu ve bu genin etrafındaki DNA bölgeleri bakımından farklılık gösterirler. Bundan dolayı, iki yakın izogenik hat arasındaki fenotipik farklılığın nedeni sadece tek bir homozigot allelik farklılıktan kaynaklanır. İki yakın izogenik hat arasında DNA seviyesinde belirlenen herhangi bir polimorfizmin sebebi, büyük bir olasılıkla bu farklılığı yaratan gen veya

DNA bölgesinin hedef gen ile çok sıkı bir şekilde linkage durumunda olmasından kaynaklanır. Yakın izogenik hatlar, çalışılan genin etrafında bulunan moleküler markörleri içeren önemli haritaların geliştirilmesinde çok değerli bir kaynaktır (Masojc, 2002).

Lr dayanıklılık genlerini taşıyan yakın izogenik hatlar yazlık buğday çeşidi Thatcher kullanılarak oluşturulmuştur. Thatcher yakın izogenik hatları dayanıklılık genlerini saptamada olduğu kadar patojen virülent kombinasyonlarının belirlenmesinde de çok yararlıdırlar (Winzeler et al., 2000). Tek izogenik hatlar dayanıklılık genlerine ait DNA markörlerini geliştirmek için kullanışlı oldukları kadar yeni çeşitlerde arzu edilen dayanıklılık genlerini birleştirmede ve piramitleştirmede de faydalıdırlar (Chelkowski et al., 2003).

Seyfarth et al., (1999) buğdayda kahverengi pasa ergin dönem bitki dayanıklılığı sağlayan *Lr35* genine markör geliştirmek amacıyla Thatcher*35* dayanıklı hattı ile duyarlı çeşit Frisal arasında yapılan melezden elde ettikleri 96 F_2 bitkisinden oluşan populasyonda 80 RFLP probu kullanmışlar ve bunlardan 51 adedinin ebeveynler arasında polimorfik olduklarını saptamışlardır. 3 RFLP probunun *Lr35* geni ile linkage durumunda olduğunu belirlemişler ve bunlardan BCD260 probunu STS markörüne dönüştürmüşlerdir. Avrupa'daki ıslah programlarından elde ettikleri 48 farklı ıslah hattında bu STS markörünü test etmişler ve hiçbir hatta söz konusu markörü tespit edememişlerdir. Bu STS markörünün *Lr35* için çok spesifik bir markör olduğunu ve *Lr35*'in diğer dayanıklılık genleri ile kombinasyonunda ıslah programlarına büyük yararlar sağlayacağını belirtmişlerdir.

Helguera et al., (2000), daha önceden *T. speltoides*'in 7S kromozomundan *T. aestivum*'un 7A kromozomuna aktarılan *Lr47* dayanıklılık geni için geliştirilen RFLP markörü *Xabc465*'i, PCR markörlerine dönüştürmeyi amaçlamışlardır. Bu nedenle bu markörün etrafındaki korunan sekanslardan primer dizayn etmişlerdir. Bu primerleri *T. speltoides* ve *T. aestivum*'daki farklı allelleri çoğaltmak, klonlamak ve sekanslamak için kullanmışlardır. Elde ettikleri bilgilerle *T. speltoides* sekanslarını belirleyip spesifik allel mutasyonlarını tespit etmişlerdir ve yeni primerler oluşturmuşlardır. 4 geri melez populasyonunda bu primerlerle *T. speltoides* segmentlerini elde etmişler ve bu bilgilerin ışığında *Xabc465* alleli için CAPS markörlerini geliştirmişlerdir. Bu CAPS markörünün F_2 veya açılma gösteren geri melez F_2 populasyonlarında homozigot *Lr47* bitkilerini seçmek için yararlı olduğunu bildirmişlerdir.

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

Liatukas (2003), her biri tek bir dayanıklılık geni taşıyan 31 adet Thatcher yakın izogenik hattında ve 6 çeşitte *Puccinia recondita* f. sp.

tritici'nin patojenitesini incelemiştir. 2000 ve 2001 yıllarında farklı çeşitlerden, ıslah hatlarından ve ıslah bahçelerinden topladığı kahverengi pas uredinosporlarını kullanan araştırıcı inoküle ettiği bitkilerden yaprak segmenti ile birlikte tek püstülleri almış ve agar, su, benzimidazole karışımında besi ortamına koymuştur. İncelemeleri sonucu; *Lr9, Lr19* ve *Lr24* genlerine karşı bütün izolatların avirülent olduğunu ve bu genlerin buğdayın yabani akrabalarından geldiğini belirtmiştir. *Lr34* genine karşı bu izolatların bir kısmının virülent bir kısmının ise avirülent olduğunu ve en duyarlı genlerin *Lr3ka, Lr17, Lr18* dayanıklılık genleri olduğunu saptamıştır. Diğer dayanıklılık genleri *Lr1, 2b, 2c, 3, 3bg, 13, 14, 14a, 16, 30, 33, 34* ve *37* izolatların bir çoğuna karşı (% 71-90) düşük bir etkinlik göstermişlerdir. % 50'den daha fazla bir oranda kültürü yapılan çeşitlerde bulunan *Lr3, 10, 13, 26* ve *34* incelenen izolatlara karşı düşük bir dayanıklılık göstermişlerdir. Bunlardan sadece *Lr26* geninin tatmin edici bir dayanıklılık sergilediğini vurgulayan araştırıcı bu genin *S. cereale*'den geldiğini diğer genlerin ise *T. aestivum*'dan alındığını ve bu nedenle dayanıklılıklarının düşük olduğunu belirtmiştir. Diğer taraftan, az çeşitte bulunan veya fazla yaygın olmayan dayanıklılık genlerinin buğdayın yabani akrabalarından geldiğini ve uzun süren bir adaptasyon sürecinden dolayı tam bir dayanıklılık gösterdiklerini vurgulamıştır.

Yakın izogenik hatların mevcut olmadığı durumlarda Bulk Segregant Analizi kullanılarak ilgilenilen özelliğe linkage durumunda bulunan markörler saptanabilir. Bu metot tek bir melezden orjinini alan ve açılma gösteren bir populasyondaki bireylerin iki havuzda toplanmış DNA'larını karşılaştırma esasına dayanır. Her havuzdaki veya bulktaki bireyler kendi içlerinde ilgilenilen gen ya da özellik bakımından aynıdır

fakat diğer bütün genler bakımından keyfi olarak seçilmiştir. Diğer bir deyişle bu bulklardan biri fenotipik gözlemlere göre arzu edilen alleli içeren, diğeri ise bu alleli içermeyen bitkilerden izole edilen DNA'lardan oluşur. İlgilenilen özellik bakımından zıtlık gösteren iki havuz, bunları ayırt eden markörü belirlemek için incelenir. Havuzlar arasındaki polimorfik markörler, havuzların oluşturulmasında dikkate alınan özelliği belirleyen lokuslara genetik olarak bağlı olacaktır (Michelmore et al., 1991; Masojc, 2002).

Yakın izogenik hatları geliştirmek için birçok geri meleze ihtiyaç duyulur ve bunların üretimi uzun süre gerektirir. Buna karşılık açılma gösteren populasyon oluşturulduktan sonra herhangi bir lokus veya genomik bölge için BSA uygulanabilir (Michelmore et al., 1991).

BSA için çoğunlukla F_2 populasyonları ve bunun yanında geri melez, tam kardeş vb. populasyonlar kullanılmaktadır. Geri melez populasyonlarından elde edilen bulklar ilgilenilen bölge etrafında daha iyi bir odaklanma sağlar. F_2 populasyonları ile incelenen bölge bakımından maksimum genetik çerçeve elde edilir (Michelmore et al., 1991). Bulk segregant analizi dominant veya kodominant markörlerle uygulanabilir.

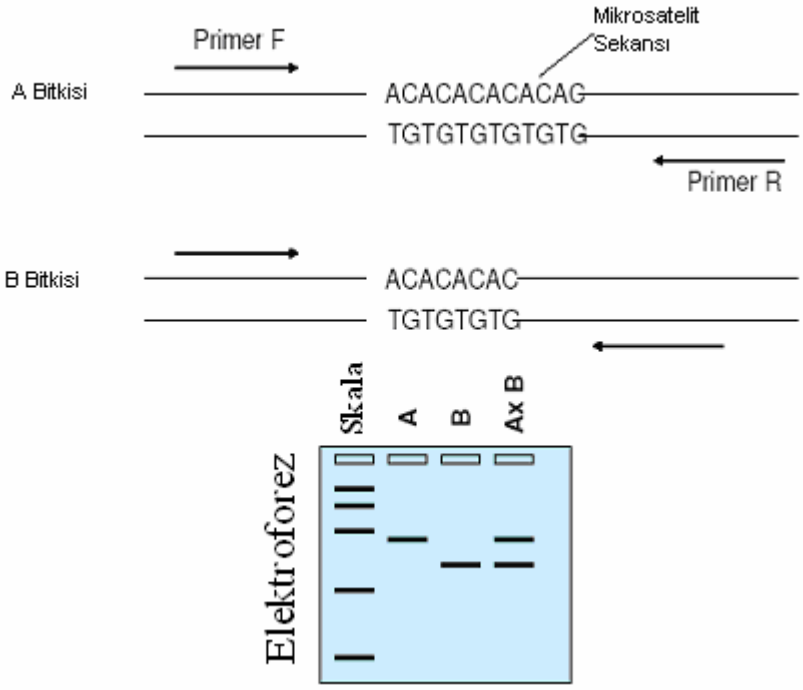
Naik et al., (1998), duyarlı Hindistan çeşitlerini kullanarak oluşturdukları yedi yakın izogenik hatta *Lr28* genini tespit etmek için RAPD yöntemini kullanmışlardır. Tekrarlanan sekansların buğday genomunda oldukça yüksek olmasından ve RAPD metodunun tekrarlanabilme özelliğinin düşük olmasından dolayı genomik DNA'da özel bir işlem uygulayan araştırıcılar 80 tesadüfi RAPD primeri ile bu genomik DNA'yı incelemişlerdir. Bir markörün yakın izogenik hatları ve

verici ebeveyni tekrarlanan duyarlı ebeveynlerden ayırt ettiğini saptamışlardır. Dayanıklı hatlarda da saptadıkları bu bandı klonlayıp, *Lr28* geni için STS markörüne dönüştürmüşlerdir. Bu markörün doğruluğunu teyit etmek için F_3 generasyonunda Bulk Segregent Analizini uygulamışlar ve dayanıklı F_3 bulklarında ve hatlarında aynı markörü tespit etmişlerdir.

2.5. SSR (Mikrosatelit) Markörleri

Bitki genomu çok sayıda basit sekans tekrarları (Simple Sequence Repeats) diğer bir deyişle mikrosatelitleri içermektedir. 6 bp'den küçük olan mikrosatelitler birbiri ardına dizilmiş tekrarlardır ve kromozomlar boyunca yüzlerce lokusa dağılmış durumdadırlar. Tipik olarak mikrosatelitler dinükleotidler $(AC)_n$, $(AG)_n$, $(AT)_n$; trinükleotidler $(TCT)_n$, $(TTG)_n$; tetranükleotidler $(TATG)_n$ olabilirler ve buradaki n mikrosatelit lokusundaki tekrarların sayısıdır. Birçok farklı lokusta bulunmalarına ek olarak poliallelik de olabilirler. Özel bir lokusdaki SSR'ı belirlemek için öncelikle bu bölgeyi içeren küçük genomik kütüphane oluşturulur. Daha sonra bu kütüphane SSR'ları saptamak amacıyla mikrosatelit problarıyla incelenir. SSR'ı içeren bölge sekanslanır ve SSR'ı içeren lokus için spesifik primerler dizayn edilir. DNA bant şablonlarını elde etmek için bu primerlerle PCR işlemi uygulanır ve bir lokusun iki allelindeki tekrarların sayısındaki farklılığa dayalı polimorfizm gel üzerinde gözlenir (Şekil 2.5). Bu nedenle elde edilen markör kodominant markördür. Buna ilaveten, SSR markörleri basit, PCR'a dayalı, aşırı derecede polimorfik ve belirlenen allellerin

sayısından ve frekansından dolayı ve de çok yakın akraba bireyleri ayırt etme kabiliyetlerinden dolayı çok informatiktirler. SSR markörleri haritalamada, çeşitlerin identifikasyonunda, germplazm muhafazasında, melezlerin belirlenmesinde, gen havuzu varyasyonu analizlerinde ve de ekonomik öneme sahip özellikler için belirleyici markörler olarak kullanılmaktadır. Ancak mikrosatelitleri ilk aşamadan itibaren belirlemek, geliştirmek pahalı ve zaman alıcıdır ve spesifik primerlere ihtiyaç duyulur (Jones et al., 1997).



Şekil 2.5. SSR markörlerinin şematik gösterimi (Salvi, 2006).

Doksanlı yılların ortalarına kadar mikrosatelit markörleri insan ve hayvan genetik çalışmalarında kolay uygulanabilen ve güvenilir markörler olarak dikkatimizi çekmektedir ancak bitkilerde bu yıllarda büyük kapsamlı çalışmalar yapılmamıştır. Bunun nedeni bu yıllara kadar bitkiler üzerinde mikrosatelit çalışmalarında kullanılacak uygun primerlerin geliştirilmemesidir (Plaschke et al. 1995). Fakat daha sonraki yıllarda bitkiler üzerinde de mikrosatelit araştırmaları yoğunlaşıp çok kullanılan markörler arasına girmiştir.

Plaschke et al., (1995) kültürü yapılan 40 buğday çeşidi ve çoğunluğu Avrupa elit materyalini içeren buğday hattında 23 buğday mikrosatelitini kullanmışlar ve 15 farklı kromozomda toplam 142 alleli belirlemişlerdir. Mikrosatelit primeri başına ortalama 6.2 allel saptayan araştırıcılar ortalama dinükleotid tekrar sayısının ise 13 ile 41 arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Çeşitler ve hatların dendogramında bütün genotipleri ayrımlamışlar ve özellikle 2 çeşidi diğerlerinden daha farklı olarak saptamışlardır. Oluşturdukları grupların, çeşitlerin pedigrileri ile ilişkili olduğunu ve genetik benzerliğin 0.44 elde edildiğini vurgulamışlardır. Az sayıda SSR'la genetik farklılığın ölçülebileceğini, ekmeklik buğday elit materyalinde çeşit identifikasyonunun yapılabileceğini belirtmişlerdir.

Ekmeklik buğdayda mikrosatelit çalışmalarında ilk işbirliği WMC (Wheat Microsatellite Consortium) tarafından 1996 yılında yapılmıştır. Bundan sonra 1997 Şubatında Uluslararası Buğday Mikrosatelit Haritalama Ağı (IWMMN) kurulmuş ve özellikle WMC'nin belirlediği primerleri genetik haritalama ile desteklemeye başlamıştır. Bu işbirliği çerçevesinde 10 üye mikrosatelit haritalama çalışmalarını

sürdürmektedir. Bu grupdan Gupta et al., (2002) daha önceden haritalanan 384 lokusa ilaveten yeni 66 mikrosatelit lokusunu haritalamışlardır. Röder et al., (1998b)'nın kullandığı materyalle aynı materyali (70 rekombinant kendilenmiş hat) kullanan araştırıcılar 58 primer çifti ile 66 mikrosatelit lokusunu belirlemişlerdir.

Röder et al., (1998a) 25 "Chinese Spring" delesyon hattında çok sayıda SSR primeri kullanarak ekmeklik buğdayın 2 homoelog kromozom grubunda dinükleotid mikrosatelit markörlerinin fiziksel dağılımını araştırmışlardır. 31 adet mikrosatelit markörü ile 2A kromozomunda 14 lokus, 2B kromozomunda 9 lokus ve 2D kromozomunda 10 lokus saptamışlardır. Mikrosatelit lokuslarının kromozom boyunca dağıldıklarını belirten araştırıcılar, tanımladıkları 28 fiziksel aralıktan 18'ini mikrosatelit markörleriyle işaretlemişlerdir.

Röder et al. (1998b), ekmeklik buğday genomuna spesifik yeni mikrosatelit primerlerini geliştirmek amacıyla ITMI (International *Triticeae* Mapping Initiative)'nin W7984 x Opata 85 melezinin 70 rekombinant kendilenmiş hattını kullanmışlardır. Toplamda 279 lokusu 230 primerle çoğaltmışlar ve belirledikleri lokusları daha önceden RFLP markörleriyle haritalanmış genetik çerçeveyle birleştirmişlerdir. A genomunda 93, B genomunda 115 ve D genomunda 71 lokusu haritalamışlardır. Geliştirdikleri SSR primer setlerinin çoğunluğunun (%80) genoma spesifik olduğunu ve sadece bir lokusu belirlediklerini, geri kalan markörlerin (%20) ise birden fazla lokusu saptadıklarını belirtmişlerdir.

Raupp et al., (2001), *Aegilops tauschii*'den *T. aestivum*'a aktarılan *Lr39* kahverengi pas dayanıklılık geninin moleküler ve sitogenetik

haritasını yapmışlardır. İnter-kromozomal haritalama için monosomik analizi, intra-kromozomal haritalama için de mikrosatelit markörlerini kullanmışlardır. *Lr39*'un sentromerden bağımsız, 2D kromozomunun kısa kolu üzerinde lokalize olduğunu saptamışlardır. *Ae. tauschii*'den köken alan Wichita TA4186 (*Lr39* genine sahip) buğday hattı ile D genomu monosomik Wichita hattı melezinin 57 F_2 bitkisinde linkage haritası için 2DS kromozomunda 8 mikrosatelit markörü kullanmışlar ve *Lr39* geninin bulunduğu yeri teyit etmişlerdir. Ayrıca 3 markörün bu genle linkage durumunda olduğunu, *Xgwm210* markörünün 10.7 cM uzaklıkla *Lr39*'a en yakın markör olarak tespit etmişlerdir.

Leonova et al., (2002) *T. aestivum* x *T. timopheevii* melezinden 5 buğday çeşidini esas alarak, kahverengi pasa dayanıklı olarak geliştirdikleri 24 hibrid buğday hattında *T. aestivum* için özel 202 mikrosatelit markörlerini kullanmışlardır. 24 hattın 11'inde 2A ve 2B kromozomları üzerinde *T. timopheevii*'den aktarılan bölgeleri tespit etmişlerdir. Kahverengi pasa dayanıklılığın bu kromozomlar üzerinde yer alan 2 gen tarafından ya da bir genin bu 2 ayrı kromozomdaki homolog allelleri tarafından idare edildiğini belirlemişlerdir.

Leonova et al., (2004) *T. timopheevii* ile *T. aestivum*'un melezlenmesiyle elde edilen, kahverengi pasa sürekli bir dayanıklılık sağlayan 842 no'lu hattı kahverengi pas dayanıklılık genlerini haritalamak için kullanmışlardır. 842 no'lu hatta mikrosatelit markörlerini kullanan araştırıcılar *T. aestivum*'un 2 kromozomunun homoelog grubunda *T. timopheevii*'den aktarılan fragmentleri polimorfik mikrosatelit markörleriyle belirlemişlerdir. Linkage analiziyle fide

dönemi dayanıklılığının 2A kromozomuyla bir ilişkisi olduğunu saptamışlardır.

Vikal et al., (2004) *Aegilops speltoides*'den ekmeklik buğdayın 4AL kromozomuna aktarılan *Lr28* genine bağlı moleküler markörleri saptamak amacıyla *Lr28* genini ve başka dayanıklılık genlerini taşıyan bazı yakın izogenik hatlarda ve duyarlı çeşitlerde mikrosatelit markörlerini incelemişlerdir. PBW343 x HD2329 (*Lr28*) melezinin F_2 populasyonunu kullanarak *Lr28* geni ile linkage gösteren Xgwm*160* markörünü tespit etmişlerdir.

Blaszczyk et al., (2004a) bir grup Thatcher yakın izogenik hattını ve 2 ıslah hattını kahverengi pas dayanıklılık genleri *Lr9, Lr10, Lr19, Lr24, Lr28, Lr29, Lr35*'e bağlı STS markörlerini ve *Lr39*'a bağlı SSR markörlerini incelemek için kullanmışlardır. *Lr9, Lr10, Lr19, Lr24* ve *Lr28* genleri için seçilen STS markörlerini 7 aksesyonda belirlemişlerdir. Araştırmalarında Thatcher yakın izogenik hatlarını pozitif kontrol olarak kullanmışlardır. *Lr9, Lr10, Lr19* ve *Lr24* dayanıklılık genlerine bağlı markörleri (sırasıyla 1100 bp, 310 bp, 130 bp ve 310 bp uzunluğunda) 7 farklı Avrupa laboratuarında saptamışlardır. Sonuç olarak *Lr9, Lr10, Lr19, Lr24, Lr29, Lr35*'e bağlı STS ve *Lr39*'a bağlı SSR markörlerinin bu genlere oldukça spesifik olduklarını ve buğdayda markörler yardımıyla seleksiyonda kullanılabileceklerini belirtmişlerdir. Fakat *Lr28* genine bağlı 378 bp uzunluğundaki amplifikasyon ürününü bu genin bulunmadığı bütün aksesyonlarda saptamışlar ve *Lr28* geni üzerinde çalışmaların devam etmesi gerektiğini belirtmişlerdir.

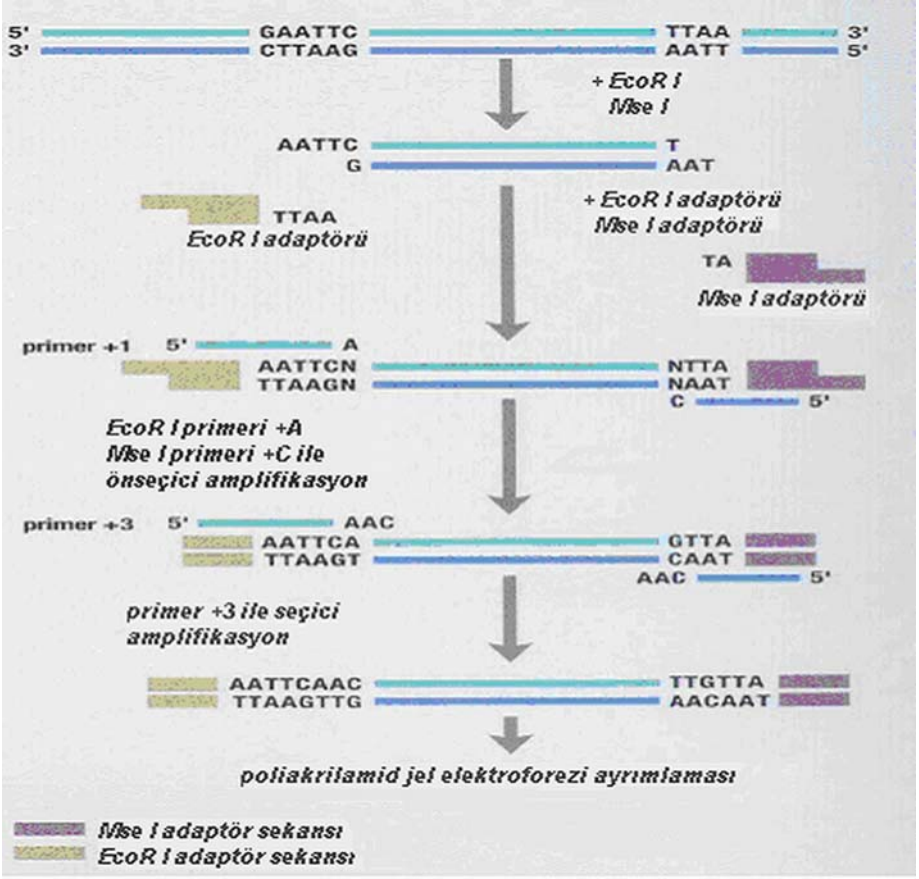
Singh et al., (2004a) buğday germplazmı KS90WGRC10'daki kahverengi pas dayanıklılık geni *Lr41* ve WX93D246-R-1'deki başka bir

gen sırasıyla *Aegilops tauschii* ve *Ae. cylindrica*'dan *T. aestivum*'a aktarılmıştır. Monosomik analizle WX93D246-R-1'daki genin 2D kromozomunda olduğunu saptamışlar ve 2D kromozomunun kısa kolunda bulunan RFLP markörü *Xgwm210*'den 11.2 cM uzaklıkta lokalize olduğunu belirtmişlerdir. WX93D246-R-1 ve TA4186 (*Lr39*) arasında yapılan melezin 300 F_2 bitkisinde duyarlı bitki saptayamayan araştırıcılar, WX93D246-R-1'de bulunan dayanıklılık geninin *Lr39* geni ile aynı gen olduğunu ya da bu 2 genin birbirleriyle çok yakın bir şekilde linkage durumunda olduğunu tespit etmişlerdir. SSR markörü *Xgdm35*'in *Lr41* geninden 1.9 cM uzaklıkta bulunduğunu ve bu genin 2D kromozomu üzerinde yer aldığını belirlemişlerdir.

2.6. AFLP Markörleri

AFLP metodu hem restriksiyon enzimlerinin hem de PCR amplifikasyonunun kullanıldığı bir yöntemdir ve DNA fragmentlerinin uzunluk farklılıkları belirlenir. AFLP yöntemindeki ilk adım genomik DNA'yı iki restriksiyon enzimiyle kesmektir. *Pst*I gibi nadiren kesen bir enzim az sayıda fragment oluşturmak amacıyla kullanılır. *Mse*I gibi sık kesen enzimler ise ortalama 256 bp uzunluğunda daha küçük fragmentler oluşturmak için uygundurlar. Sık kesen enzimleri kullanmak sadece gel elektroforezinde çok fazla fragment görmemize neden olacaktır. İkinci adım kesilen DNA fragmentinin ucuna kısa, spesifik DNA sekansının bağlanmasıdır, tabiki diğer ucuna da farklı bir sekans bağlanacaktır. Bu sekanslar ve hemen yanındaki komşu restriksiyon bölgeleri, PCR primerlerinin bağlanacağı bölgeler olarak görev yaparlar. PCR işleminde kullanılan primerler bağlanacakları bölgenin hemen yanındaki 1 ile 3

nükleotidi tanıyacak ve eşleşecek şekilde dizayn edilirler ve bu nedenle fragmentlerin seçici amplifikasyonu yapılır (Jones et al., 1997) (Şekil 2.6). Amplifikasyon ürünü poliakrilamid jel üzerinde analiz edildiğinde birey başına ortalama 50 ile 100 arasında bant gözlenir. AFLP sistemini kurmak teknik olarak zor ve pahalıdır ancak çok sayıda lokusu belirler, polimorfizm oranı yüksektir ve karmaşık bir DNA parmakizi oluşturur ki bu da tanımlamada, yüksek çözünürlükte haritalamada ve markör yardımıyla klonlamada kullanılabilir (Jones et al., 1997).



Şekil 2.6. AFLP markörlerinin şematik gösterimi (Salvi, 2006).

İncirli and Akkaya (2001), Türk makarnalık buğdayları arasındaki genetik ilişkiyi AFLP markörlerini kullanarak ilk kez belirlemişlerdir. 18 *Eco* ve *Mse* AFLP primer kombinasyonu ile toplam 189 polimorfik lokus elde etmişler ve primer kombinasyonu başına polimorfik markör sayısını 4 ile 24 arasında saptamışlardır. 9 kışlık ve 6 yazlık makarnalık buğday çeşidinde elde ettikleri genetik ilişkileri çeşitlerin pedigrileri ile uyumlu bulmuşlardır. "Nei72"nin genetik uzaklık analizini uygulayan araştırıcılar en uzak çeşit olarak Berkmen-469 (kışlık) ve Diyarbakır-88 (yazlık)'i belirlemişlerdir. Selçuklu-97 ve Sofu çeşitlerini de en yakın çeşitler olarak saptamışlardır.

Messmer et al., (2000) kahverengi pasa sürekli dayanıklılığın QTL haritasını çıkarmak için 10 yıldan fazla bir süre kahverengi pasa dayanıklılık gösteren İsveç kışlık buğday çeşidi Forno ile *T. spelta* varyetesi kışlık Oberkulmer buğdayı arasında yaptıkları melezin 204 F_5 rekombinant kendilenmiş hattında kahverengi pasa dayanıklılığı incelemişlerdir. Daha önce bu populasyonun 230 markör lokusu ile genetik haritasını çıkaran araştırıcılar, 4 farklı çevrede kahverengi pasa dayanıklılık seviyesini ve yaprak ucu nekrosisini kriter olarak kullanmışlardır. Araştırıcılar yaprak dayanıklılığında 8 QTL (6'sı Forno çeşidinden kalıtılmış), yaprak ucu nekrosisinde 10 QTL (6'sı Forno çeşidinden kalıtılmış) saptamışlardır. 4 yaprak dayanıklılığı QTL'inin yaprak ucu nekrosisi QTL'i ile aynı olduğunu ve bu lokusdaki Forno allellerinin yaprak ucu nekrosisi kadar dayanıklılık seviyesini de yükselttiğini belirlemişlerdir.

Kolmer (2001), Kanada'nın farklı bölgelerinden temin ettiği 69 kahverengi pas izolatının virülent testini 22 Thatcher yakın izogenik

hattının fide döneminde yapmış ve *Lr22b* genini taşıyan Thatcher hattında ergin dönem dayanıklılığını incelemiştir. İzolatları spesifik 10 farklı AFLP primeri ile de test eden araştırıcı kullandığı hatlarda 37 farklı virülent fenotip belirlemiştir. 164 AFLP markörüne dayanarak izolatlardan 69 moleküler fenotip saptamıştır. Virülent ve AFLP fenotiplemesine dayanan gruplar arasındaki korelasyon 0.53 çıkmıştır. Araştırıcı elde ettiği sonuçlardan Kuzey Amerika'da yeni kahverengi pas ırklarının bulunduğunu belirtmiştir.

Prins et al., (2001) *Thinopyrum*'dan aktarılmış *Lr19* dayanıklılık genini taşıyan buğday kromozom bölgesinde AFLP ve STS markörlerini araştırmışlardır. *Lr19* genini taşıyan segmentin delesyon ve rekombinant hatlarını kullanan araştırıcılar *Lr19*'u taşıyan hatlarda bir AFLP bandı belirlemişler ve bu bandı STS markörüne dönüştürmüşlerdir. Bir delesyon hattı hariç *Lr19*'u taşıyan bütün hatlarda 130 bp uzunluğunda bir PCR fragmenti elde etmişler ve bu sekansı *Lr19*'a ait ilk markör olarak belirtmişlerdir.

Hazen et al., (2002) bazı buğday aksesyonları ile genellikle genetik haritalama populasyonu olarak kullanılan Opata 85 x W7984 melezinden elde edilen 69 rekombinant kendilenmiş hatta AFLP markörlerini incelemişlerdir. Elde ettikleri bantların çoğunluğu (% 76.8) *T. aestivum* aksesyonları arasında monomorfik olarak gözlenmiştir. Kullandıkları 10 primer kombinasyonundan elde ettikleri 153 polimorfik bandın 140'nın kromozom lokasyonunu belirlemişlerdir. Ayrıca *T. aestivum* germplazmı olarak 37 çeşit ve 10 farklı ülkeden topladıkları yerel buğday türlerinde de AFLP ile genetik farklılığı inceleyen araştırıcılar rekombinant kendilenmiş hatlarda haritasını çıkardıkları bantların diğer germplazm,

aksesyon ve türlerde daha çok polimorfik olabileceklerini bildirmişlerdir.

Neu et al., (2002) ekmeklik buğdayda kahverengi pasa, kara pasa ve külleme hastalığına dayanıklılık sağlayan *Lr20–Sr15–Pm1* lokusunun öncelikle izolasyonunu yapmışlar, *Lr20* ve *Pm1* genlerini 3 farklı F_2 populasyonunu kullanarak haritalamışlardır. 60 RFLP, 4 SSR, 2 RAPD ve 1 adet STS markörünü kullanan araştırıcılar I. populasyonda 8 markörü, II. populasyonda 12 markörü haritalamışlardır. Ancak III. populasyonda bütün markörler monomorfik sonuçlar vermiş ve markörlerin tam bir linkage haritalamasını yapamamışlardır. Bunun nedenini, baskılanmış rekombinasyondan dolayı probların çok yakın bir şekilde fiziksel linkage durumunda olmasına bağlamışlardır.

Chelkowski et al., (2003) 40 farklı *Lr* genini ve bunların allellerini bulunduran 39 adet Thatcher yakın izogenik hattında, 8 adet kahverengi pas dayanıklılık genine spesifik STS, SCAR ve CAPS primerlerini kullanmışlardır. *Lr1, Lr9, Lr10, Lr19, Lr24, Lr28, Lr37* ve *Lr47* genleri ile linkage durumunda olan söz konusu primerlerin güvenilir sonuçlar verdiklerini saptamışlardır. *Lr1* geni markörünün amplifikasyon ürününü, duyarlı Thatcher ve *Lr2a, Lr2b, Lr2c* ve *Lr19* hariç incelenen diğer tüm yakın izogenik hatlarda da belirlemişlerdir. *Lr1, Lr10, Lr28* hatlarının ve Thatcher'ın PCR ürünlerinin sekans analizi bunların, hedeflenen kromozom bölgesinde Lr1/6*Thatcher (TLR621) ve duyarlı Thatcher (TH621)'da bulunan orijinal allelden farklılaşmış bir allel taşıdıklarını göstermiştir. *Lr28* markörü, *Lr28* genini taşıyan yakın izogenik hat ile birlikte diğer 21 hatta da gözlenmiştir.

Greganova et al., (2003) Slovakya kışlık buğday çeşitlerinde bazı kahverengi pas dayanıklılık genleri için daha önceden geliştirilmiş

markörleri test etmişlerdir. *Lr9* ve *Lr24* genleri için STS, *Lr35* geni için SCAR ve *Lr13* geni için de SSR markörlerini araştırdıkları çalışmalarında söz konusu 4 markörün de güvenilir sonuçlar verdiğini ve PCR reaksiyonu ile kolay, hızlı bir şekilde belirlenebildiklerini saptamışlardır. *Lr9, Lr24* ve *Lr35* genlerinin aktarıldığı, ekmek yapım kalitesi iyi olan buğday genotiplerinde elde edilen sonuçlarla markörler yardımıyla seleksiyonun önemli olacağını 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 F_5 bitkisinin ve bunların F_6 hatlarının 3 mevsim boyunca kahverengi ve kara pasa karşı reaksiyonlarını ölçmüşlerdir. Araştırıcılar 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.

Wisniewska et al., (2003) CIMMYT'den temin ettikleri 18 adet yazlık buğday hattının, Polanya'da yetiştirilen 12 yazlık buğday çeşidinin ve dayanıklı kontrol olarak da Frontana ve Sumai3 çeşitlerinin tarla koşullarında kahverengi pasa dayanıklılıklarını araştırmışlardır. Polonya çeşitlerinde varsayılan *Lr* genlerinin kontrolü için 16 adet patojen izolatı ile multipatojen testi yapmışlardır. Kullandıkları hatlarda, çeşitlerde ve de pozitif kontrol olarak Thatcher yakın izogenik hatlarda STS

markörleri ile *Lr1, Lr9, Lr10, Lr24, Lr28* ve *Lr37* genlerini incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarda Polonya çeşitlerinin tamamı kahverengi pasa duyarlılık göstermiştir. 10 CIMMYT hattı ile Frontana çeşidi bazı çevrelerde hastalığa dayanıklılık göstermiş ve bunların dayanıklılık kaynağı olabileceğini vurgulamışlardır. *Lr10* geni markörünü 6 CIMMYT hattında elde etmişler ancak *Lr1* ve *Lr28* genlerinin markörünü incelenen bütün hatlarda gözlemlemişlerdir. Lr9, *Lr24* ve *Lr37* genlerinin markörlerini ise söz konusu hatların hiçbirinde saptayamamışlardır.

Stepien et al., (2003) 7 farklı Avrupa ülkesinden toplanan 37 buğday çeşidinde *Lr9, Lr10, Lr19, Lr24, Lr26* ve *Lr37* kahverengi pasa dayanıklılık genlerini incelemek için STS markörlerini kullanmışlardır. Ayrıca 2 germplazm koleksiyonundan bazı dayanıklılık genlerini taşıyan 22 aksesyonu da çalışmalarına dahil etmişlerdir. STS markörlerine ek olarak *Lr24* geni için SCAR, *Lr47* geni için ise CAPS markörlerini de söz konusu bu genleri belirlemek için kullanmışlardır. Her bir markör spesifik bir DNA fragmentini çoğaltmıştır. 3 *Lr* genine (*Lr10, Lr26* ve *Lr37*) ait buğday çeşitlerinde bazı markörler belirlemişlerdir. Diğer 4 genin (*Lr9, Lr19, Lr24* ve *Lr47*) markörlerini ise dayanıklılık geni taşıyan ıslah hatlarında saptamışlardır. *Lr10, Lr26* ve *Lr37* genleri için belirledikleri markörlerin, markörler yardımıyla seleksiyonda yararlı olabileceğini vurgulamışlardır.

Zhong et al., (2003) iki farklı kahverengi pas (*P. hordei*) dayanıklılık genini (*Rph2* ve *Rph6*) taşıyan Bolivia arpa genotipi ile duyarlı genotip Bowman arasında yaptığı melezlemenin F_4 generasyonundan elde ettiği homozigot dayanıklı hattı (Bolivia *Rph6*)

ikinci bir melezlemenin baba ebeveyni olarak kullanmış ve Bowman genotipi ile tekrar melezlemiştir. Bu melezden elde ettiği 122 F_2 bitkisi ve bunların F_3 ailelerini haritalama populasyonu olarak kullanmıştır. Bulk segregent analizi temelinde AFLP ve RFLP markörlerini kullanan araştırıcılar *Rph6* geninin 3H kromozomunda, MWG2021 ve BCD907 RFLP markörlerinden sırasıyla 4.4 ve 1.2 cM uzaklıkta olduğunu saptamışlardır. Ayrıca *Rph6* geninin diğer dayanıklılık genleri ile allelik ilişkisini inceleyen araştırıcılar *Rph6* geninin *Rph5* geni ile allelik ilişkisini ve *Rph7* geni ile de linkage durumunda olduğunu belirlemişlerdir.

Ling et al., (2004) 200'den fazla *Ae. tauschii* aksesyonunda *Lr1* dayanıklılık genine avirülent kahverengi pas izolatlarının reaksiyonunu incelemişlerdir. Aksesyonların yaklaşık % 3.5'u düşük enfeksiyon tipi göstermişlerdir. Hem İsviçre hem de Meksika'da dayanıklılık gösteren Tr.t. 213 hattını seçmişler ve bu hatta yaptıkları genetik analizler sonucu dayanıklılığın tek bir dominant gen tarafından sağlandığını ve bu genin *Lr1* ile aynı kromozomal pozisyonda yer aldığını saptamışlardır. RFLP markörlerini kullanan araştırıcılar bu dayanıklılık geni ile *Lr1* geninin aynı atasal lokustan geldiğini belirlemişlerdir.

Blaszczyk et al., (2004b) Avrupa'da ekimi yapılan 16 adet kışlık buğday çeşidinde 5 farklı kahverengi pas dayanıklılık genini (*Lr3, Lr10, Lr13, Lr14a ve Lr37*) fide döneminde belirlemişlerdir. Çeşitlerde, yakın izogenik hatlarda ve açılma gösteren populasyonda *Lr10* ve *Lr37* dayanıklılık genlerinin varlığını STS ve SCAR markörlerini kullanarak teyit etmişlerdir. *Lr37* genini taşıyan Kris çeşidi ile bu geni taşımayan Nutka çeşidi arasında yapılan melezin F_3 populasyonunu haritalama

populasyonu olarak kullanmışlar ve 2AS kromozomu üzerinde *Lr37* genine spesifik 2 STS/SCAR markörü ile 1 SSR markörü saptamışlardır. *Xgwm1176* SSR markörünün STS ve SCAR markörlerinden 4.1 cM linkage uzaklığında olduğunu belirtmişlerdir.

Singh et el., (2004b) ekmeklik buğdayda *Lr19* ve *Lr24* kahverengi pas dayanıklılık genleri için geliştirilmiş moleküler markörleri, spesifik dayanıklılık genlerini taşıyan bazı genotiplerde ve çeşitli melez kombinasyonlarının farklı F_2 döllerinden elde edilen açılma gösteren hatlarda incelemişlerdir. Bir Thatcher yakın izogenik hattında (Tc**Lr19*) ve Inia66//CMH81A575 genotipinde *Lr19*'un, Arkan, Blue Boy II, Agent ve CI17907 genotiplerinde ise *Lr24*'ün STS markörünü tespit etmişlerdir. Aynı markörler ebeveyn hatlarında ve çeşitli melez kombinasyonlarının F_3 hatlarında da elde edilmiş ve kullanılan STS markörlerinin söz konusu genler için markörler yardımıyla seleksiyonda kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Khan et al., (2005) Avustralya çeşitleri Schomburgk ile Yarralinka arasında yapılan melezden tek tohum yöntemi ile geliştirilen F_4 populasyonunda, kahverengi pas dayanıklılık geni *Lr3a* ve kara pas dayanıklılık geni *Sr22*'ye ait moleküler markörleri araştırmışlardır. Bu genlerin kromozom lokasyonlarına göre seçilmiş toplam 1330 RAPD, 100 ISSR ve 33 SSR primerini kullanmışlardır. ISSR markörü *UBC* 840_{540}'ı *Lr3a*'dan 6.0 cM uzaklıkta saptamışlardır. SSR markörü *cfa2019* ve *cfa2123*'ü *Sr22*'den sırasıyla 5.9 cM ve 6.0 cM uzaklıklarda belirlemişlerdir.

Blaszczyk et al., (2005) *Lr1, Lr9, Lr10, Lr13, Lr19, Lr21, Lr24, Lr26, Lr28, Lr35* ve *Lr37* genlerini taşıyan Thatcher yakın izogenik

hatlarının toplam 286 lokusunda ^{Pst1}AFLP metoduyla DNA polimorfizmini araştırmışlardır. Seçilmiş 33 primer ile 16 aday markör tespit etmişlerdir. Elde edilen sonuçları teyit etmek için bazı çeşitlerde *Lr24, Lr26* ve *Lr37* genleri için özel markörler kullanılarak bu genlerin varlığını ya da yokluğunu incelemişlerdir. AFLP markörü *P42-530*'u STS markörüne dönüştüren araştırıcılar, bu markörün *Lr37* spesifik markörü (*Cs1Vrga13*) ile linkage durumunda olduğunu ve aralarındaki uzaklığın 1.7 cM olduğunu saptamışlardır. *Agropyron elongatum*, *Secale cereale* ve *Aegilops ventricosa*'dan translokasyon ile hexaploid buğdayda oluşan DNA değişikliklerini saptamak için ^{Pst1}AFLP metodunun etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Obert et al., (2005) yeni kahverengi pas dayanıklılık genlerini belirlemek amacıyla Afganistan ve İran'dan temin ettikleri 40 yerel buğday türünü 2 farklı lokasyonda yetiştirmişler ve dayanıklılıklarını incelemişlerdir. Dayanıklı buldukları PI 289824 ile duyarlı T112'yi melezlemişler ve bunların 8 F_1, 176 F_2 ve 139 $F_{2:3}$ ailesinin fide döneminde dayanıklılık testini yapmışlardır. PI 289824'deki dayanıklılığın tek bir dominant gen tarafından idare edildiğini belirleyen araştırıcılar AFLP analizi ile dayanıklılık markörünü saptamışlardır. Bu markörden STS markörünü geliştirmişler ve dayanıklılık geninden 2.3 cM uzaklıkta olduğunu gözlemişlerdir. Aynı genin mikrosatelit markörleriyle 5B kromozomunun kısa kolunda olduğunu saptayan araştırıcılar aynı kromozom bölgesinde daha önceden haritalanan *Lr52* geni ile belirledikleri bu genin allelizm testinin gerekli olduğunu çünkü bu genlerin farklı genler olduğunu vurgulamışlardır.

Xu et al., (2005) kahverengi pasa yüksek seviyede yavaş paslanma dayanıklılığı gösteren CI 13227 hattı ile Suwon92 melezinden geliştirilen rekombinant kendilenmiş hatlarda moleküler markörlerden yararlanarak bu dayanıklılığı araştırmışlardır. 459 AFLP ve 28 SSR markörünü de kullanan araştırıcılar ayrıca hastalık şiddetini, gelişimini, enfeksiyon oranını ve süresini incelemişlerdir. Hastalığın gelişimi, şiddeti ve enfeksiyon oranı ile ilişkili 2 kantitatif özellik lokusu bulmuşlardır. Hastalık süresi ile ilgili üçüncü bir lokusu 2DS kromozomu üzerinde saptamışlardır.

Shoaib and Arabi (2006), Suriye'de yetiştirilen önemli beş *T. aestivum* L. ve on *T. turgidum* ssp. *durum* çeşidinde 11 *Eco*RI-*Mse*I primer kombinasyonunu analiz ederek AFLP markörleri ile bu çeşitler arasındaki genetik farklılığı araştırmışlardır. Belirledikleri 525 AFLP marköründen sadece % 46.67'sini polimorfik bulmuşlardır. AFLP verilerinden yaptıkları cluster analizinde çeşitleri 2 ana gruba ayırmışlar ve bu ayrımlama çeşitlerin orijinlerini yansıtmıştır. *T. aestivum* L. çeşitleri bir grupta, *T. turgidum* ssp. *durum* çeşitleri ikinci grupta yer almıştır. Tüm çeşitler arasındaki genetik farklılığı 0.884 olarak belirlemişlerdir. Buğday genetik varyasyon çalışmalarında AFLP analizinin önemli bilgiler verdiğini vurgulamışlardır.

Dieguez et al., (2006) 6BL kromozomu üzerinde *Lr3* genini taşıyan Arjentin buğday çeşidinin 33 adet kahverengi pasa duyarlı spontan hattını sitogenetik olarak C-bantlamasıyla karakterize etmişler ve birçok hattın 6BL kromozomu üzerinde delesyonların oluştuğunu saptamışlardır. 55 AFLP markörünün fiziksel haritası ile delesyonlar arasındaki farklılıkları belirlemişler ve 6BL kromozomunu, delesyon kırılma noktalarına göre 7

bölgeye bölmüşlerdir. Polimorfik 9 AFLP markörünü, *Lr3* geninin linkage haritasını oluşturmak için kullanmışlar ve *Lr3* geninin 7 AFLP marköründen 0.9 cM uzaklıkta olduğunu saptamışlardır.

Gupta et al., (2006) *Agropyron elongatum*'dan aktarılan ve 7DL kromozomunda lokalize olan *Lr19* genini RAPD ve SSR markörleriyle işaretlemişlerdir. Dayanıklı Thatcher yakın izogenik hattı (*Lr19*) ile duyarlı hat Agra Local arasında yaptıkları melezin 340 F_2 bitkisini haritalama populasyonu olarak kullanmışlardır. $F_{2:3}$ 140 homozigot bitkide moleküler markörleri saptayan araştırıcılar 16 RAPD markörünün *Lr19* ile linkage durumda olduğunu belirtmişlerdir. 7DL kromozomu üzerinde 9 mikrosatelit markörünü yine *Lr19* ile linkage halinde haritalamışlardır. Ayrıca *Lr19*'un markörü olarak belirlenen 2 RAPD markörünü SCAR markörüne dönüştürmüşlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Materyali

Bu çalışmanın materyalini CIMMYT (International Maize and Wheat Improvement Center)'ten temin edilmiş kahverengi pasa dayanıklı hatlar, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiş kahverengi pasa duyarlı çeşitler ve bunlar arasında yapılan melezlerin erken generasyonları (F_1 ve F_2) oluşturmuştur. CIMMYT'den temin edilen hatlar Thatcher yakın izogenik hatları olup, bunların her biri farklı kahverengi pas dayanıklılık genlerini taşımaktadır (Çizelge3.1).

Çizelge 3.1. CIMMYT'den temin edilen Thatcher yakın izogenik hatları.

Hatlar	Pedigrileri	*Lr* genleri
1	Tc*6 / Centenario	*Lr1*
2	Tc*6 / Webster	*Lr2a*
3	Tc*6 / Carina	*Lr2b*
4	Tc*6 / Loros	*Lr2c*
5	Tc*6 / Democrat	*Lr3*
6	Bage / Tc*8	*Lr3bg*
7	Tc*6 / Aniversario	*Lr3ka*
8	Transfer / Tc*6	*Lr9*
9	Tc*6 / Exchange	*Lr10*
10	Tc*2 / Hussar	*Lr11*
11	Exchange / Tc*6 APRes.	*Lr12*
12	Tc*6 / Frontana	*Lr13*
13	Selkirk / Tc*6	*Lr14a*
14	Tc*6 / Mario Escobar	*Lr14b*

15	Tc*6 / Kental 483 (RL6052)	*Lr15*
16	Tc*6 / Exchange	*Lr16*
17	Klein Lucero / Tc*6	*Lr17*
18	Tc*7 / Africa 43	*Lr18*
19	Tc*7 / Transl. 4-A. elongatum	*Lr19*
20	Tc*6 / Jimmer	*Lr20*
21	Tc*6 / RL 5406 T.C.xAe. squ...	*Lr21*
22	Tc*6 / RL 5404 T.C.xAe. squ...	*Lr22*
23	Lee 310 / Tc*6	*Lr23*
24	Tc*6 / Agent	*Lr24*
25	Tc*6 / Transec.	*Lr25*
26	Tc*6 / St-1-25	*Lr26*
27	Tc*6 / C-77-1	*Lr28*
28	Tc*6 / CS7D-Ag#11	*Lr29*
29	Tc*6 / Terenzio	*Lr30*
30	Tc*6 / 3 / Ae. squarrosa	*Lr32*
31	Tc*6 / PI 58548 (1+gene)	*Lr33*
32	Tc*6 / PI 58548 (2+gene)	*Lr34*
33	Tc*6 / RL5711	*Lr35*
34	Tc*6 / VPM	*Lr37*
35	Tc*6 / T7 Kohn	*Lr38*
36	Tc*6 / TMR-514-12-24	*Lr38*
37	Tc*6 / T. spelt.	*Lr44*
38	Tc*6 / 8404	*Lr44*
39	Tc*6 / Carina	*LrB*
40	Tc*6 / PI 268316	*LrB*
41	Tc*6 / V336	*LrW*

Thatcher Buğdayı

Marquis x Iumillo F_1 ile Marquis x Kanred F_1'nin melezlenmesi sonucu 1934 yılında geliştirilmiş ekmeklik buğday germplazmıdır. Yazlıktır, taneleri kırmızı ve serttir. Kara pasa dayanıklı ancak kahverengi pasa duyarlıdır. Adaptasyonu geniş, verimi ve kalitesi yüksek bir buğdaydır ve pasa dayanıklı varyetelerin ilk serisidir (Anonim, 2007a).

Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen yerli çeşitler;

-Cumhuriyet 75
-İzmir 85
-Ziyabey 98
-Meta 2002
-Gönen 98

Çeşitlerin Özellikleri

Cumhuriyet 75

- Yazlık ekmeklik buğday çeşididir,
- Boy 100-110 cm, sapı sağlamdır,
- Başaklar beyaz, seyrek, uzun ve beyaz kılçıklıdır,
- Beyaz iri taneli, bin tane ağırlığı 42-48 g'dır,
- Sarı pasa hassas, kahverengi pasa dayanıklı, kara pasa orta hassastır,
- Hızlı ve güçlü gelişme gösterdiğinden diğer çeşitlerden daha geç ekilmelidir,

- Aşırı sulama yatmaya neden olabileceğinden sulama erken safhalarda ve özenle yapılmalıdır.

İzmir 85

- Yazlık ekmeklik buğday çeşididir,
- Sağlam saplı, orta boylu (95-105 cm) ve yatmaya dayanıklıdır,
- Beyaz başaklı ve kılçıklıdır,
- Yarı-sert beyaz taneli olup bin tane ağırlığı 32-35 g'dır,
- Kahverengi pasa hassas, sarı ve kara pasa orta dayanıklıdır,
- Yavaş gelişme gösterdiğinden soğuğa toleranslı olan bu çeşit kışları serin geçen, kurak ve stresli yıllardaki stabil verimiyle dikkati çekmektedir.

Ziyabey 98

- Yazlık ekmeklik buğday çeşididir,
- 95-105 cm boyundadır,
- Başakları beyaz ve kılçıklıdır,
- Taneleri beyaz yarı sert olup bin tane ağırlığı 35-40 g'dır,
- Pas hastalıklarına dayanıklı olup, sarı ve kahverengi pasın sorun olduğu yöreler için yüksek verimli iyi bir seçenektir.

Meta 2002

- Yazlık ekmeklik buğday çeşididir,
- 95-105 cm boyundadır,
- Başakları beyaz ve kılçıklıdır.
- Taneleri beyaz yarı sert olup bin tane ağırlığı 27-37 g, hektolitre ağırlığı 78-81 kg ve protein oranı % 10.4-12.7'dir,
- Pas hastalıklarına dayanıklı olup, sarı ve kahverengi pasın sorun

olduğu yöreler için yüksek verimli iyi bir seçenektir,

- 2002 yılında tescil edilmiş olup ortalama verimi 850 kg/da'dır.

Gönen 98

- Yazlık ekmeklik buğday çeşididir,
- Sapı sağlam, orta boylu (100-110 cm) ve yatmaya dayanıklıdır,
- Başaklar kılçıksız ve beyaz renklidir,
- Beyaz sert taneli olup bin tane ağırlığı 34-38 gr. Yüksek su tutma kapasitesi nedeniyle değirmenciler tarafından benimsenmektedir,
- Kahverengi pasa hassas, sarı pasa orta hassas, kara pasa orta dayanıklıdır,
- Kuzey Ege ve Güney Marmara'nın en verimli ve kaliteli çeşitlerinden biridir (Anonim, 2007b).

Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü'den sağlanan ve genellikle Ege Bölgesi'nde yetiştirilen bu çeşitlerin kahverengi pasa duyarlı oldukları belirtilmiş ancak yukarıda açıklandığı gibi tohum katalog bilgileri bazı çeşitlerin kahverengi pasa dayanıklı olduğunu göstermiştir. Kahverengi pasa reaksiyonlarını incelemek amacıyla dayanıklı çeşitler de bu çalışmaya dahil edilmiştir.

3.1.2. Deneme Yerinin Özellikleri

Bu çalışmada çeşit ve hatların yetiştirilmesi, melezleme ve inokülasyon çalışmaları 2003-2005 yıllarında Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme tarlası ve serasında

gerçekleştirilmiştir. Deneme tarlasının görünümü ve toprağının fiziksel ve kimyasal özellikleri sırasıyla Şekil 3.1 ve Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Şekil 3.1. Deneme tarlasından bir görünüm.

Çizelge 3.2. Deneme tarlası 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

3.1.3. İklim Durumu

Deneme yerine ait iklim verileri (2003-2005 vejetasyon dönemi) Bornova Meteoroloji İstasyonu'ndan temin edilmiştir. Bu iklim verilerine Çizelge 3.3'de yer verilmiştir.

Çizelge 3.3. Bornova iklim verileri (2003-2005 yılları ve çok yıllık ortalamalar).

	2003				2004				2005				Uzun Yıllar Ortalaması			
	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	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	8.6	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	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	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	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	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	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	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	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**	**17.1**	**633.2**	**60.3**	**7.6**

OHS: Ortalama Hava Sıcaklığı (°C)

OON: Ortalama Oransal Nem (%)

TY: Toplam Yağış (mm)

OGS: Ortalama Güneşlenme Süresi (saat/gün)

3.2. Yöntem

3.2.1. Melezleme ve İnokülasyon Çalışmaları

Araştırma projesi çerçevesinde ebeveyn olarak kullanılan kahverengi pasa duyarlı çeşitler ile dayanıklı hatlar 2003-2005 yıllarında melez bahçelerinde yetiştirilmiş, kahverengi pasa reaksiyonlarını incelemek amacıyla kahverengi pas inokülantı ile inoküle edilmiş ve farklı ebeveyn kombinasyonları arasında melezlemeler yapılmıştır.

2003-2004 Üretim Yılı

Melezlemelerde kullanılacak dayanıklı 41 adet buğday hattı ile 4 adet duyarlı çeşit (Cumhuriyet 75, Meta 2002, İzmir 85 ve Ziyabey 98) melezlemeye uygun olacak vejetasyon sürelerinin belirlenmesi amacıyla farklı zamanlarda ekilmişlerdir. Çeşit ve hatların birinci ekim zamanı 11.11.2003, ikinci ekim zamanı 29.12.2003 tarihinde yapılmıştır. Sadece yerli çeşitlerin tohumları 25.02.2004 ve 12.03.2004 tarihlerinde de ekilerek, çeşit ve hatlar arasında yapılacak melez sayısının arttırılması planlanmıştır. Tüm ekim zamanlarında elde az miktarda bulunan dayanıklı hatlara ait tohumlar birer sıra, yerli çeşitlerin tohumları ikişer sıra, sıra aralığı 60 cm olacak şekilde ekilmişlerdir.

Dayanıklılık testi uygulamak amacıyla dayanıklı hatlara ve duyarlı çeşitlere 09.04.2004 tarihinde kahverengi pas inoküle edilmiştir. 1 l saf su içerisine yaklaşık 100 ml Glycerin ($CH_2OHCHOHCH_2OH$, MW:92.10) ve Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen kahverengi pas sporları karıştırılarak oluşturulan süspansiyon kardeşlenme döneminin başlangıcında olan bitkilerin bayrak

yaprağına şırınga ile enjekte edilmiştir. İnokülasyon, pas inokülantının geç temin edilmesinden dolayı tam zamanında yapılamamıştır. Dayanıklı hatlarda ve duyarlı çeşitlerde enfeksiyon gözlenmemiştir. Ayrıca duyarlı çeşitlere kıyasla, dayanıklı buğday hatlarının daha geç sapa kalktıkları, bu nedenle başaklanma sürelerinin daha uzun olduğu gözlenmiştir. Dayanıklı hatlar ile duyarlı çeşitler arasında mümkün olduğu kadar çok melezleme yapılmaya çalışılmış ve farklı ekim zamanlarında bulunan ve aşağıda belirtilen kombinasyonlarda toplam 63 adet başak melezlenmiştir.

Melezleme işleminde ana olarak seçilen başaklardan erkek organlar (anterler) uzaklaştırılmış (emaskülasyon) ve başaklar izole edilmiştir. Emaskülasyonu takiben izole edilen başaklar 1-2 gün içinde tozlayıcı olarak belirlenen bitkilerden alınan başakla twirl yöntemine göre tozlanmış ve tekrar izole edilmiştir (Şekil 3.2). Melezlemelerin çoğunda anne olarak yerli çeşitler, baba olarak da hatlar kullanılmış ancak bazı melezlemelerde bunun tam tersi uygulanarak resiproklu melez başaklar da elde edilmiştir. Melezlerde hasat işlemi tek başaklar halinde 11.06.2004 ve 28.06.2004 tarihlerinde, dayanıklı hat ve duyarlı çeşitlerde ise sıralar halinde 29.06.2004 tarihinde gerçekleştirilmiştir. Melez başaklar daha sonra elde ayıklama işlemine tabi tutulmuş, dayanıklı hat ve çeşitlerin tanelenmesi de makinada yapılmıştır.

2003-2004 üretim yılında yapılan melez kombinasyonları;

Cumhuriyet 75 x 2 no'lu hat	Cumhuriyet 75 x 12 no'lu hat
Cumhuriyet 75 x 6 no'lu hat	Cumhuriyet 75 x 18 no'lu hat
Cumhuriyet 75 x 10 no'lu hat	Cumhuriyet 75 x 21 no'lu hat

Cumhuriyet 75 x 24 no'lu hat
Cumhuriyet 75 x 26 no'lu hat
Cumhuriyet 75 x 29 no'lu hat
Cumhuriyet 75 x 37 no'lu hat
Cumhuriyet 75 x 39 no'lu hat
Cumhuriyet 75 x 40 no'lu hat
Meta 2002 x 2 no'lu hat
Meta 2002 x 6 no'lu hat
Meta 2002 x 11 no'lu hat
Meta 2002 x 13 no'lu hat
Meta 2002 x 14 no'lu hat
Meta 2002 x 18 no'lu hat
Meta 2002 x 22 no'lu hat
Meta 2002 x 32 no'lu hat
Meta 2002 x 34 no'lu hat
İzmir 85 x 6 no'lu hat
İzmir 85 x 12 no'lu hat
İzmir 85 x 22 no'lu hat
Ziyabey 98 x 2 no'lu hat
16 no'lu hat x Meta 2002
22 no'lu hat x İzmir 85
22 no'lu hat x Cumhuriyet 75
23 no'lu hat x Cumhuriyet 75
23 no'lu hat x İzmir 85
36 no'lu hat x Cumhuriyet 75
40 no'lu hat x Cumhuriyet 75

(a) (b)

Şekil 3.2. Emaskülasyon yapılan bir başak (a) ile melezlenmiş bir başak (b).

2004-2005 Üretim Yılı

Melez başaklarda bulunan tohum sayısına, tohumların büyüklüklerine ve de aynı kombinasyonda yapılan melez başak sayısına göre 2003-2004 üretim yılında yapılan melezlerden aşağıda belirtilen 10 farklı melez kombinasyonu bu üretim yılında F_1 bitkilerini elde etmek için seçilmiştir.

Meta 2002 x 2 no'lu hat	İzmir 85 x 12 no'lu hat
Meta 2002 x 14 no'lu hat	Ziyabey 98 x 2 no'lu hat
Meta 2002 x 32 no'lu hat	Cumhuriyet 75 x 10 no'lu hat
Meta 2002 x 34 no'lu hat	Cumhuriyet 75 x 40 no'lu hat
İzmir 85 x 6 no'lu hat	40 no'lu hat x Cumhuriyet 75

Seçilen bu melezlerin tohumları (her melez başağın tohumlarının yarısı) serada keselere 20.12.2004 tarihinde ekilmişlerdir. Melezlerin % 90'ı çıkış göstermiş ve bunlar 10.03.2005 tarihinde tarlaya aktarılmıştır. 21.06.05 tarihinde F_1 bitkilerinde başak hasadı yapılarak her F_1 bitkisinin başakları ayrı kese kağıtlarına koyulmuştur.

Seçilen bu melezlerin ebeveynleri, ikinci bir melez bahçesi oluşturmak ve inokülasyon yapılmak amacıyla tekrar bu üretim yılında da ekilmişlerdir. Bunlardan dayanıklı ebeveynler (2, 6, 10, 12, 14, 32, 34, 40 No'lu hatlar) uygun çiçeklenme zamanlarını yakalamak amacıyla 12.10.2004 tarihinde serada fide torbalarına ekilmişlerdir. Ekimler her hattan 20 torba, her torbaya ikişer tohum olmak üzere yapılmıştır. 14.12.2004 tarihinde bunlar tarlaya aktarılmış ve aynı tarihte söz konusu dayanıklı hatların ikinci ve 4 duyarlı çeşidin de birinci ekimleri tarlaya

doğrudan yapılarak farklı ekim zamanları oluşturulmuştur. Duyarlı çeşitlerin tarlaya ikinci ekimleri 12.01.2005 tarihinde yapılmıştır. Bu dönemdeki melezleme çalışmalarında, Ege Bölgesinde en çok yetiştirilen ekmeklik buğday çeşitleri arasında bulunan, yüksek kaliteli Gönen 98 çeşidinin de yer alması düşünülmüş ve Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilerek 23.02.2005 tarihinde serada keselere, 25.02.2005 tarihinde ise tarlaya ekimi yapılmıştır. 31 Mart, 12-13-20-21-25-26 Nisan 2005 tarihlerinde yerli çeşitler ve dayanıklı hatlar yine Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen kahverengi pas inokülantı ile inoküle edilmiştir. İnokülasyon sonucunda Cumhuriyet 75 çeşidinin yapraklarında pas püstüllerine rastlanırken diğer yerli çeşitlerde ve dayanıklı hatlarda reaksiyon gözlenmemiştir. Nisan ayının farklı tarihlerinde 3 duyarlı yerli buğday çeşidi (Cumhuriyet 75, İzmir 85, Gönen 98) 8 dayanıklı hat (2, 6, 10, 12, 14, 32, 34 ve 40) ile tozlanmıştır. Aşağıda belirtildiği gibi bazı dayanıklı hatlar da anne olarak kullanılarak İzmir 85 çeşidinde resiproklu melezler yapılmıştır. Melez bahçesinde ve F_1 bitkilerinde gübreleme, sulama ve yabancı ot temizliği yapılarak bakım işlemleri uygulanmıştır. Bu yıl yapılmış olan melezlerin hasadı yine tek başak hasadı halinde 24.06.05 tarihinde, ebeveynlerin hasadı ise parsel biçer-döveri ile 06.07.05 tarihinde yapılmıştır. Söz konusu melezlerin ve F_1 bitkilerinin başakları tanelenmiştir.

2004-2005 üretim yılında yapılan melez kombinasyonları;

Cumhuriyet 75 x 2 no'lu hat
Cumhuriyet 75 x 10 no'lu hat
Cumhuriyet 75 x 12 no'lu hat
Cumhuriyet 75 x 14 no'lu hat
Cumhuriyet 75 x 34 no'lu hat
Cumhuriyet 75 x 40 no'lu hat

İzmir 85 x 2 no'lu hat
İzmir 85 x 6 no'lu hat
İzmir 85 x 10 no'lu hat
İzmir 85 x 12 no'lu hat
İzmir 85 x 14 no'lu hat
İzmir 85 x 32 no'lu hat
İzmir 85 x 34 no'lu hat
İzmir 85 x 40 no'lu hat
Gönen 98 x 2 no'lu hat
Gönen 98 x 6 no'lu hat
Gönen 98 x 10 no'lu hat
Gönen 98 x 12 no'lu hat
Gönen 98 x 14 no'lu hat
Gönen 98 x 32 no'lu hat
Gönen 98 x 34 no'lu hat
Gönen 98 x 40 no'lu hat
2 no'lu hat x İzmir 85
10 no'lu hat x İzmir 85
12 no'lu hat x İzmir 85
14 no'lu hat x İzmir 85
32 no'lu hat x İzmir 85
34 no'lu hat x İzmir 85

Çalışmanın DNA analizleri için 2003-2004 üretim yılında melezlemeleri yapılan ve 2004-2005 üretim yılında da melez tohumları ekilerek F_1 generasyonu elde edilen iki farklı melez kombinasyonu seçilmiştir. Daha önce de belirtildiği gibi seçim kriteri olarak melez başaklarda bulunan tohum sayısı, tohumların büyüklükleri ve de aynı kombinasyonda yapılan melez başak sayısı dikkate alınmıştır. Bu kombinasyonlar;

Cumhuriyet 75 x 10 no'lu hat
İzmir 85 x 12 no'lu hat arasında yapılan melezlerdir.

3.2.2. İnokülasyon Çalışmaları

DNA analizleri için seçilen melezlerin ebeveynleri ve F_2 tohumlukları inokülasyon için Almanya Justus Liebig Üniversitesi, Agronomi ve Bitki Islahı Enstitüsü I, Bitki Islahı Bölümü işbirliği ile

yine Almanya Epidemioloji ve Dayanıklılık Kaynakları Enstitüsü'ne gönderilmiştir.

"İzmir 85 x 12 no'lu hat" tek melez başağından elde edilen 16 tohumdan 8 adedi DNA analizleri için muhafaza edilmiştir. Diğer 8 adet melez tohum F_1 bitkilerini elde etmek için 2004-2005 üretim yılında ekilmiştir. Elde edilen 8 adet F_1 bitkisi ayrı ayrı hasat edilerek farklı kese kağıtlarına koyulmuştur. Bunların her birinden 12'şer tohum alınarak toplam 96 bitkiden oluşacak F_2 populasyonu tohumluğu oluşturulmuştur. Aynı şekil ve sayıda "Cumhuriyet 75 x 10 no'lu hat" F_2 populasyonu tohumluğu oluşturulmuş inokülasyon için söz konusu enstitüye gönderilmiştir.

Epidemioloji ve Dayanıklılık Kaynakları Enstitüsü'nde seçilen melezlerin ebeveynleri ve F_2 bitkileri öncelikle Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen kahverengi pas inokülantı ile inoküle edilmiştir. Tohumlar 6x6 cm büyüklüğündeki küçük kaplara ekilmişler ve ilk yapraklar tamamen gelişinceye kadar (8-10 gün) serada tutulmuşlardır. Daha sonra 20°C'de ve 16 saat ışıklandırmanın yapıldığı büyüme odasına alınmışlardır. Pas sporlarının yapışmasını sağlamak için bitkilerin üzerine hafifçe Tween 20 solüsyonu (1 ml/1 lt su) püskürtülmüştür. Hiçbir dayanıklılık geni taşımayan, oldukça fazla duyarlı ve daha önceden kahverengi pas inokülantı ile ağır bir şekilde enfekte edilmiş bitkiler spor vericisi olarak kullanılmış ve diğer bitkilerin üzerine düzenli bir şekilde silkelenmiştir. İnoküle edilen bitkiler plastik folyo ile 1 gün boyunca izole edilmiştir. Kahverengi pas enfeksiyonu bundan sonraki yaklaşık 10 gün içinde değerlendirilmiştir. Değerlendirme bitinceye kadar spor verici bitkiler büyüme odasında

tutulmuşlardır. Ayrıca, daima taze sporların bulunması için her hafta yeni verici bitkiler ekilmiştir.

Ancak inokülasyondan Türkiye'de olduğu gibi olumlu bir sonuç alınamamış, bitkilerde herhangi bir reaksiyon gözlenmemiştir. Bunun nedeni kahverengi pas inokülantının uygun bir şekilde kurutulmadığı ve dolayısı ile inokülasyon öncesi çimlenme göstermediği olarak belirtilmiştir.

Daha sonra yeni pas inokülantı arayışına girilmiş ve ebeveyn olarak kullanılan dayanıklı hatların taşıdıkları dayanıklılık genlerine (*Lr11* ve *Lr13*) spesifik kahverengi pas ırkları araştırılmıştır. 12 no'lu hattın taşıdığı dayanıklılık geni *Lr13*'e spesifik ırk bulunmuş ve bundan sonraki inokülasyon çalışmaları bu hattın ebeveyn olarak kullanıldığı "İzmir 85 x 12 no'lu hat" F_1'i, ebeveynleri ve F_2 populasyonu üzerinde yukarıda belirtilen yönteme göre tekrar uygulanmış ve hastalık okumaları yapılmıştır. Hastalık okumalarında açılma göstermediğinden F_2 populasyonu DNA analizlerine dahil edilmemiştir.

Yukarıda da belirtildiği gibi *Lr13* geni için inokülasyon çalışmaları bitkiler fide dönemindeyken yapılmıştır. *Lr13* geni genellikle ergin bitki döneminde dayanıklılık sağlamasına rağmen genin belirlenmesi fide döneminde yapılabilmektedir (Pretorius et al., 1984; Seyfarth et al., 2000a; Park and McIntosh, 1994; Blaszczyk et al., 2004b).

3.2.3. DNA Analizleri

Çalışmanın DNA analizleri Almanya Justus Liebig Üniversitesi, Agronomi ve Bitki Islahı Enstitüsü I, Bitki Islahı Bölümü laboratuarlarında yürütülmüştür.

Araştırmanın DNA analizleri aşamasında ağırlıklı olarak AFLP markörleri ve ayrıca da SSR markörleri kullanılarak kahverengi pasa dayanıklılık sağlayan *Lr11* ve *Lr13* genine bağlı markör veya markörler saptanmaya çalışılmıştır. Gerek pas inokülantının çalışmaması gerekse yeni pas inokülantının bir süre boyunca temin edilememesi nedeniyle araştırmanın DNA analizlerine inokülasyon sonuçları alınmadan, CIMMYT'ten temin edilen hatlarla başlanmıştır.

CIMMYT'den temin edilen ve kahverengi pasa tek gen bakımından dayanıklılık gösteren Thatcher yakın izogenik hatları adından da anlaşıldığı gibi birbirlerine çok yakın genotipler olup genlerinin hemen hemen hepsi aynıdır ve taşıdıkları dayanıklılık genleri bakımından farklılık gösterirler. Bu bilginin ışığı altında DNA analizlerinin başlangıcında söz konusu CIMMYT hatları kullanılmış ve *Lr11* ile *Lr13* genlerinin markörleri araştırılmıştır.

3.2.3.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için CIMMYT'den temin edilen 41 adet Thatcher yakın izogenik hattının ve yerli çeşitlerin (Cumhuriyet 75, İzmir 85 ve Gönen 98) tohumları, Almanya Justus Liebig Üniversitesi, Agronomi ve Bitki Islahı Enstitüsü I, Bitki Islahı Bölümü serasında ekim potlarına ekilmişlerdir. Yaklaşık 25 gün sonra bitkiler 10-15 cm boyunda iken her bitkiden iki grup yaprak örneği alınmıştır. Alınan taze yapraklar sıvı nitrojen içerisinde bulunan 2 ml'lik eppendorf tüplerine koyulmuş, tüpler sonra tekrar nitrojen içerisine alınmıştır. 1. grup yaprak örnekleri DNA

izolasyonu için kullanılmış, 2. grup yaprak örnekleri ise izolasyonda karşılaşılabilecek herhangi bir soruna karşı –20 de saklanmıştır.

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

DNA izolasyonunda kullanılan porselen havanların içlerine daha önceden %96'lık etanol koyulmuş, ateşle yakılarak etanolün uzaklaştırılması sağlanmış ve böylece sterilize edilmiştir. Porselen havanlar daha sonra DNA izolasyonunda kullanılmak üzere derin dondurucuda saklanmıştır. Yaprak örnekleri (100-200 mg) her biri sıvı nitrojen koyulmuş porselen havanlarda toz haline gelinceye kadar ezilmiştir. Toz haline gelen örnekler 2 ml'lik eppendorf tüplerine aktarılmış ve üstlerine daha önceden 65 °C'ye ayarlanmış su banyosunda bulunan DNA ekstraksiyon tamponundan (Çizelge 3.4) 700 µl koyulmuştur. Tüpler çalkalanarak 65 °C'de bulunan su banyosunda 20-30 dakika inkübasyona tabi tutulmuşlar ve her 5-10 dakikada bir tekrar çalkalanmışlardır.

Çizelge 3.4. DNA ekstraksiyon 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

İnkübasyondan sonra tüpler su banyosundan çıkartılıp üzerlerine 700 µl soğuk 24:1 oranında kloroform/isoamil alkol eklenmiş ve yaklaşık 5 dakika hafifçe çalkalanmıştır. Tüpler mikro santrifüjde 10000 rpm'de (4 °C'de) 10 dakika santrifüjlendikten sonra tüplerin üst sıvı kısımları alınarak yeni tüplere aktarılmış ve üstlerine 600 µl tekrar aynı oranda kloroform/isoamil alkol eklenmiş ve 5 dakika çalkalanmıştır. Daha sonra 10000 rpm'de (4 °C'de) 10 dakika santrifüjlenmiştir. Üst sıvı kısımlar alınarak yeni tüplere aktarılmış, tüplere 50 µl NH_4OAc (10 M) ve 60 µl NaOAc (3 M, pH 5.5) ilave edilerek yavaşça çalkalanmıştır. Çalkalama işleminden sonra tüplere 500 µl soğuk 2-Propanol eklenmiş, tekrar yavaşça çalkalandıktan sonra DNA görülür hale gelmiştir. Tüpler 4000 rpm'de 4 dakika santrifüjlendikten sonra tüplerdeki sıvı kısım pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. DNA'ların üzerine 200 µl yıkama solüsyonu (% 70'lik EtOH/10 mM NH_4OAc) koyularak tüpler +4 °C'de en az 10 dakika bekletilmiştir. 4000 rpm'de 4 dakika santrifüj işleminden sonra tüplerdeki sıvı kısım tekrar pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Tüplerin kapakları açılarak 37 °C'deki inkübatörde (termomikser) 5-10 dakika bekletilmiş ve alkolün uzaklaştırılması sağlanmıştır. Alkol tamamen uçtuktan sonra DNA'ların üzerine 100-200 µl TE (10 mM Tris pH: 8.0, 1 mM EDTA pH: 8.0) tamponu koyulmuş ve tüpler tekrar 37 °C ve 350 rpm'deki inkübatörde 1-2 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. DNA'lar tamamen çözündükten sonra –20 °C'de saklanmıştır.

3.2.3.2. DNA Miktar Tayini

PCR reaksiyonlarında her örnekten eşit miktarda DNA kullanılması gereklidir. Bu nedenle bitkilere ait izole edilen DNA'ların miktarlarının tayini yapılmıştır.

DNA ölçümü DNA fluometrede (DyNA Quant 200, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA) yapılmıştır. Ölçümlenen DNA miktarlarına göre her bitkinin DNA'ları µl'de 25 ng olacak şekilde ddH_2O ile seyreltilmiştir.

3.2.3.3. Bulkların Oluşturulması

Lr11 ve *Lr13* genlerine ait moleküler markörlerin araştırılmasında daha çok primer kombinasyonu incelenebilmesi amacıyla CIMMYT'ten temin edilen Thatcher yakın izogenik hatlarının DNA'larından Çizelge 3.5'de verildiği gibi bulklar oluşturulmuştur. *Lr11* ve *Lr13*'e ait markörleri belirlemeye çalıştığımız için bu genleri taşıyan hatlar ayrı değerlendirilmiş, ancak bu genlerin yer aldığı aynı kromozomda başka dayanıklılık genleri taşıyan hatların DNA'ları bir bulkta yer almıştır. Örneğin, *Lr11* dayanıklılık geni 2A kromozomunda yer almaktadır ve bu geni taşıyan 10 No'lu hattın DNA'sı bulklara dahil edilmemiş, ayrı değerlendirilmiş ancak 2A kromozomunda lokalize olan *Lr17* ve *Lr37* genlerini taşıyan 17 No'lu hat ve 34 No'lu hattın DNA'ları bir bulkta yer almıştır. *Lr13* geni 2BS kromozomunda yer almaktadır ve aynı şekilde 2BS veya 2B kromozomunda dayanıklılık genleri taşıyan hatların DNA'larından da diğer bir bulk oluşturulmuştur. 2A ve 2B

kromozomunda dayanıklılık geni taşımayan diğer hatlardan ise herhangi bir ortak özellik gözetmeden bulklar oluşturulmuştur. Dayanıklılık genlerinin kromozom lokasyonları McIntosh et al. (2003)'dan alınmıştır.

Bulkları oluşturmak için hatların seyreltilmiş DNA'larından eşit miktarlarda alınmış ve bir araya getirilmiştir.

Çizelge 3.5. Thatcher yakın izogenik hatlarından oluşturulan DNA ve DNA bulkları.

DNA ve Bulklar	Oluşturan hat ve dayanıklılık genleri	Kromozom lokasyonları
1-DNA	10 No'lu hat- *Lr11*	2A
2-DNA Bulkı	17 No'lu hat - *Lr17* 34 No'lu hat - *Lr37*	2AS 2AS
3-DNA	12 No'lu hat - *Lr13*	2BS
4-DNA Bulkı	16 No'lu hat - *Lr16* 23 No'lu hat - *Lr23* 33 No'lu hat - *Lr35*	2BS 2BS 2B
5-DNA Bulkı	1 No'lu hat - *Lr1* 2 No'lu hat - *Lr2a* 3 No'lu hat - *Lr2b* 4 No'lu hat - *Lr2c* 5 No'lu hat - *Lr3* 6 No'lu hat - *Lr3bg* 7 No'lu hat - *Lr3ka* 8 No'lu hat - *Lr9* 9 No'lu hat - *Lr10*	5DL 2DS 2DS 2DS 6BL 6BL 6BL 6BL 1AS
6-DNA Bulkı	11 No'lu hat - *Lr12* 13 No'lu hat - *Lr14a* 14 No'lu hat - *Lr14b* 15 No'lu hat - *Lr15* 18 No'lu hat - *Lr18* 19 No'lu hat - *Lr19* 20 No'lu hat - *Lr20*	4BS 7BL 7BL 2DS 5BL 7DL 7AL

	21 No'lu hat - *Lr21* 22 No'lu hat - *Lr22*	1DS 2DS
7-DNA Bulkı	24 No'lu hat - *Lr24* 25 No'lu hat - *Lr25* 26 No'lu hat - *Lr26* 27 No'lu hat - *Lr28* 28 No'lu hat - *Lr29* 29 No'lu hat - *Lr30* 30 No'lu hat - *Lr32* 31 No'lu hat - *Lr33* 32 No'lu hat - *Lr34*	3D 4BS 1BL 4AL 7DS 4AL 3DS 1BL 7DS
8-DNA Bulkı	35 No'lu hat - *Lr38* 36 No'lu hat - *Lr38* 37 No'lu hat - *Lr44* 38 No'lu hat - *Lr44* 39 No'lu hat - *LrB* 40 No'lu hat - *LrB* 41 No'lu hat - *LrW*	6DL - 1B - - - -

3.2.3.4. AFLP Markörleri

Çalışmanın AFLP analizleri; reaksiyon adımları, adaptörleri ve AFLP primerleri Zabeau and Vos ve Vos et al. (Zabeau and Vos, 1993; Vos et al.,1995)'un yöntemlerinde olduğu gibi uygulanmıştır. *Eco*RI ve *Mse*I restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilen genomik DNA uçlarına yine aynı enzimlerin adaptörleri bağlanmış, iki ön amplifikasyondan sonra ve Çizelge 3.9'da verilen 246 farklı primer kombinasyonu ile AFLP analizleri tamamlanmıştır.

3.2.3.4.1. Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzimleri ile Kesilmesi

AFLP Core Reagent Kiti (Invitrojen GmbH, Karlsruhe/Germany) kullanılarak *Eco*RI ve *Mse*I enzimleri ile genomik DNA (150 ng) kesilmiştir. 25 µl olan toplam hacmi; 1 X Reaksiyon Buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM Mg-acetate, 250 mM K-acetate], *Eco*RI/*Mse*I enzimlerinin her birinden 2.5 ünite ve 12 µl distile su oluşturmuştur. Reaksiyon 37°C'de 2 saat ve 70°C'de 15 dakika inkübasyon ile thermocycler (GeneAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems) cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.4.2. Adaptörlerin Bağlanması

24 µl adaptör bağlama solüsyonu [*Eco*RI/*Mse*I adapters, 0.4 mM ATP, 10mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM Mg-acetate, 50 mM K-acetate] ve 1 ünite T4 DNA ligaz (Invitrojen GmbH, Karlsruhe/Germany), restriksiyon enzimleriyle kesilen genomik DNA solüsyonun üzerine koyularak *Eco*RI ve *Mse*I enzimleriyle kesilen genomik DNA'ya, aynı enzimlerin komplementer uçlarını taşıyan adaptörler (*Eco*RI ve *Mse*I adaptörleri, Çizelge 3.8) bağlanmıştır. Adaptörlerin bağlanması adımı bir önceki adımın hemen ardından yapılmıştır. Reaksiyon 20°C'de 2 saat thermocycler cihazında inkübasyona tabi tutularak tamamlanmış ve bundan sonraki aşama için örnekler –20'de saklanmıştır.

3.2.3.4.3. +0 Ön Amplifikasyonu

Adaptörlerin bağlanması aşamasından sonra örnekler 1:10 oranında TE buffer (10 mM Tris pH: 8.0, 1 mM EDTA pH: 8.0) ile seyreltilmiştir. +0 ön amplifikasyonu seçici olmayan *Eco*RI-Primer E00 ve *Mse*I-Primer M00 primerleri ile 20 döngüden oluşan Çizelge 3.6'da belirtilen programa göre gerçekleştirilmiştir. Toplam 50 µl olan reaksiyon hacminde; 5 µl seyreltilmiş örnekler, 75 ng *Eco*RI-Primer E00 ve *Mse*I-Primer M00 (MWG Biotech.) primerlerinin her birinden, 0.2 mM dNTP (PeQlab Biotech. GmbH), 1 X PCR buffer (Eppendorf Brinkmann Ins. USA), 1 ünite Taq Polimeraz enzimi (Eppendorf Brinkmann Ins. USA) yer almıştır. PCR amplifikasyonu thermocycler (GeneAmp PCR System 9700, Perkin Elmer) cihazında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.6. +0 ve +1 ön amplifikasyonunda uygulanan PCR programı.

Reaksiyon	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Denatürasyon	94°C	3 dakika	1
Denatürasyon	94°C	30 saniye	20
Yapışma	56°C	1 dakika	
Uzama	72°C	1 dakika	
Uzama	72°C	5 dakika	1

3.2.3.4.4. +1 Ön Amplifikasyonu

+0 ön amplifikasyonundan sonra örnekler 1:10 oranında TE buffer ile tekrar seyreltilmiştir. +1 ön amplifikasyonunda ek birer nükleotid ile seçici *Eco*RI-Primer E01, EcoRI-Primer E02, *Mse*I-Primer M02 ve MseI-Primer M03 primerleri kullanılmıştır (Çizelge 3.8). +1 ön amplifikasyonunda üç farklı primer kombinasyonu uygulanmış olup bunlar; E01 M02, E01 M03 ve E02 M03 kombinasyonlarıdır. Toplam 50 µl olan reaksiyon hacminde +0 ön amplifikasyonunda belirtilen bileşenler ve konsantrasyonları aynen uygulanmış, sadece yukarıda belirtilen primer kombinasyonları 75 ng olacak şekilde kullanılmıştır. PCR amplifikasyonu da +0 ön amplifikasyonunda belirtilen sıcaklık ve döngülerde (Çizelge 3.6), aynı thermocycler cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.4.5. +3 Amplifikasyonu (Seçici Amplifikasyon)

+1 ön amplifikasyonundan sonra örnekler 1:10 oranında TE buffer ile tekrar seyreltilmiştir. Seçici amplifikasyonda kullanılan *Eco*RI/*Mse*I primerleri üç seçici nükleotid taşımaktadırlar (Çizelge 3.9.). Ayrıca bu amplifikasyonda kullanılan *Eco*RI primerlerinin hepsi 5'-ucunda floresan boya IRD700 veya IRD800 (MWG Biotech.) ile işaretlenmiştir. Toplam 20 µl reaksiyon hacminde; 5 µl seyreltilmiş örnekler, 10 ng 5'-IRD700 işaretlenmiş *Eco*RI primeri veya 20 ng 5'-IRD800 işaretlenmiş *Eco*RI primeri, 30 ng *Mse*I primeri (MWG Biotech.), 0.2 mM dNTP (PeQlab Biotech. GmbH), 1 X PCR buffer (Eppendorf Brinkmann Ins. USA), 0.5

ünite Taq Polimeraz enzimi (Eppendorf Brinkmann Ins. USA) yer almıştır. PCR amplifikasyonu yine aynı thermocycler cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR işlemi Vos et al., (1995)'un yönteminde küçük değişikliklerle Çizelge 3.7'de belirtilen programa göre yapılmıştır.

Çizelge 3.7. +3 amplifikasyonunda uygulanan PCR programı.

	Reaksiyon	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
	Denatürasyon	94°C	3 dakika	1
1. Devre	Denatürasyon	94°C	30 saniye	12
	Yapışma	65°C -0.7 °C/döngü	30 saniye	
	Uzama	72°C	1 dakika	
2. Devre	Denatürasyon	94°C	30 saniye	22
	Yapışma	56°C	30 saniye	
	Uzama	72°C	1 dakika	
	Uzama	72°C	5 dakika	1

Çizelge 3.8. +0, +1 ve +3 amplifikasyonunda kullanılan primerler, adaptörler ve sekansları.

Primer ve adaptörler	Sekansları
EcoRI Adaptörü	5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'
	3'-CCATGCGTCAGATGCTC-5'
EcoRI-Primer E00	5'-GACTGCGTACCAATTC-3'

EcoRI-Primer E01	5’-GACTGCGTACCAATTCA-3’
EcoRI-Primer E02	5’-GACTGCGTACCAATTCC-3’
MseI Adaptörü	5’-TACTCAGGACTCAT-3’
	3’-GAGTCCTGAGTAGCAG-5’
MseI-Primer M00	5’-GATGAGTCCTGAGTAA-3’
MseI-Primer M02	5’-GATGAGTCCTGAGTAAC-3’
MseI-Primer M03	5’-GATGAGTCCTGAGTAAG-3’

Çizelge 3.9. +3 amplifikasyonunda kullanılan AFLP primer kombinasyonları ve baz dizilişleri.

Primer Kombinasyonları	Primer Sekansları
E01 M02 Kombinasyonunda Kullanılanlar	
E31 M47	AAA-3’ CAA-3’
E32 M47	AAC-3’ CAA-3’
E31 M48	AAA-3’ CAC-3’
E32 M48	AAC-3’ CAC-3’
E31 M49	AAA-3’ CAG-3’
E32 M49	AAC-3’ CAG-3’
E39 M47	AGA-3’ CAA-3’
E40 M47	AGC-3’ CAA-3’
E39 M48	AGA-3’ CAC-3’
E40 M50	AGC-3’ CAT-3’
E39 M54	AGA-3’ CCT-3’
E40 M54	AGC-3’ CCT-3’
E31 M50	AAA-3’ CCT-3’
E32 M50	AAC-3’ CCT-3’
E31 M52	AAA-3’ CCC-3’
E32 M52	AAC-3’ CCC-3’
E31 M54	AAA-3’ CCT-3’
E32 M54	AAC-3’ CCT-3’

E39 M51	AGA-3’ CCA-3’
E40 M51	AGC-3’ CCA-3’
E39 M52	AGA-3’ CCC-3’
E40 M52	AGC-3’ CCC-3’
E39 M53	AGA-3’ CCG-3’
E40 M53	AGC-3’ CCG-3’
E31 M51	AAA-3’ CCA-3’
E32 M51	AAC-3’ CCA-3’
E31 M53	AAA-3’ CCG-3’
E32 M53	AAC-3’ CCG-3’
E31 M55	AAA-3’ CGA-3’
E32 M55	AAC-3’ CGA-3’
E39 M55	AGA-3’ CGA-3’
E40 M55	AGC-3’ CGA-3’
E39 M56	AGA-3’ CGC-3’
E40 M56	AGC-3’ CGC-3’
E39 M57	AGA-3’ CGG-3’
E40 M57	AGC-3’ CGG-3’
E31 M56	AAA-3’ CGC-3’
E32 M56	AAC-3’ CGC-3’
E31 M57	AAA-3’ CGG-3’
E32 M57	AAC-3’ CGG-3’
E31 M58	AAA-3’ CGT-3’
E32 M58	AAC-3’ CGT-3’
E39 M58	AGA-3’ CGT-3’
E40 M58	AGC-3’ CGT-3’
E39 M59	AGA-3’ CTA-3’
E40 M59	AGC-3’ CTA-3’
E39 M60	AGA-3’ CTC-3’
E40 M60	AGC-3’ CTC-3’
E31 M59	AAA-3’ CTA-3’

E32 M59	AAC-3’ CTA-3’
E31 M60	AAA-3’ CTC-3’
E32 M60	AAC-3’ CTC-3’
E31 M61	AAA-3’ CTG-3’
E32 M61	AAC-3’ CTG-3’
E41 M59	AGG-3’ CTA-3’
E42 M59	AGT-3’ CTA-3’
E41 M60	AGG-3’ CTC-3’
E42 M60	AGT-3’ CTC-3’
E41 M61	AGG-3’ CTG-3’
E42 M61	AGT-3’ CTG-3’
E33 M58	AAG-3’ CGT-3’
E34 M58	AAT-3’ CGT-3’
E33 M59	AAG-3’ CTA-3’
E34 M59	AAT-3’ CTA-3’
E33 M61	AAG-3’ CTG-3’
E34 M61	AAT-3’ CTG-3’
E41 M49	AGG-3’ CAG-3’
E42 M49	AGT-3’ CAG-3’
E41 M53	AGG-3’ CCG-3’
E42 M53	AGT-3’ CCG-3’
E41 M58	AGG-3’ CGT-3’
E42 M58	AGT-3’ CGT-3’
E33 M56	AAG-3’ CGC-3’
E34 M56	AAT-3’ CGC-3’
E33 M57	AAG-3’ CGG-3’
E34 M57	AAT-3’ CGG-3’
E33 M60	AAG-3’ CTC-3’
E34 M60	AAT-3’ CTC-3’
E41 M56	AGG-3’ CGC-3’
E42 M56	AGT-3’ CGC-3’

E41 M57	AGG-3’ CGG-3’
E42 M57	AGT-3’ CGG-3’
E41 M50	AGG-3’ CAT-3’
E42 M48	AGT-3’ CAC-3’
E01 M03 Kombinasyonunda Kullanılanlar	
E41 M63	AGG-3’ GAA-3’
E42 M63	AGT-3’ GAA-3’
E41 M64	AGG-3’ GAC-3’
E42 M64	AGT-3’ GAC-3’
E41 M66	AGG-3’ GAT-3’
E42 M66	AGT-3’ GAT-3’
E33 M63	AAG-3’ GAA-3’
E34 M63	AAT-3’ GAA-3’
E33 M64	AAG-3’ GAC-3’
E34 M64	AAT-3’ GAC-3’
E33 M66	AAG-3’ GAT-3’
E34 M66	AAT-3’ GAT-3’
E31 M63	AAA-3’ GAA-3’
E32 M63	AAC-3’ GAA-3’
E31 M64	AAA-3’ GAC-3’
E32 M64	AAC-3’ GAC-3’
E31 M66	AAA-3’ GAT-3’
E32 M66	AAC-3’ GAT-3’
E41 M67	AGG-3’ GCA-3’
E42 M67	AGT-3’ GCA-3’
E41 M68	AGG-3’ GCC-3’
E42 M68	AGT-3’ GCC-3’
E41 M69	AGG-3’ GCG-3’
E42 M69	AGT-3’ GCG-3’
E33 M67	AAG-3’ GCA-3’
E34 M67	AAT-3’ GCA-3’

E33 M68	AAG-3’ GCC-3’
E34 M68	AAT-3’ GCC-3’
E33 M69	AAG-3’ GCG-3’
E34 M69	AAT-3’ GCG-3’
E31 M67	AAA-3’ GCA-3’
E32 M67	AAC-3’ GCA-3’
E31 M68	AAA-3’ GCC-3’
E32 M68	AAC-3’ GCC-3’
E31 M69	AAA-3’ GCG-3’
E32 M69	AAC-3’ GCG-3’
E41 M70	AGG-3’ GCT-3’
E42 M70	AGT-3’ GCT-3’
E41 M71	AGG-3’ GGA-3’
E42 M71	AGT-3’ GGA-3’
E41 M73	AGG-3’ GGG-3’
E42 M73	AGT-3’ GGG-3’
E33 M70	AAG-3’ GCT-3’
E34 M70	AAT-3’ GCT-3’
E33 M71	AAG-3’ GGA-3’
E34 M71	AAT-3’ GGA-3’
E33 M73	AAG-3’ GGG-3’
E34 M73	AAT-3’ GGG-3’
E39 M70	AGA-3’ GCT-3’
E40 M70	AGC-3’ GCT-3’
E39 M71	AGA-3’ GGA-3’
E40 M71	AGC-3’ GGA-3’
E39 M73	AGA-3’ GGG-3’
E40 M73	AGC-3’ GGG-3’
E43 M63	ATA-3’ GAA-3’
E45 M63	ATG-3’ GAA-3’
E43 M64	ATA-3’ GAC-3’

E45 M64	ATG-3’ GAC-3’
E43 M66	ATA-3’ GAT-3’
E45 M66	ATG-3’ GAT-3’
E43 M67	ATA-3’ GCA-3’
E45 M67	ATG-3’ GCA-3’
E43 M68	ATA-3’ GCC-3’
E45 M68	ATG-3’ GCC-3’
E43 M69	ATA-3’ GCG-3’
E45 M69	ATG-3’ GCG-3’
E43 M74	ATA-3’ GGT-3’
E45 M74	ATG-3’ GGT-3’
E43 M75	ATA-3’ GTA-3’
E45 M75	ATG-3’ GTA-3’
E43 M78	ATA-3’ GTT-3’
E45 M78	ATG-3’ GTT-3’
E31 M74	AAA-3’ GGT-3’
E32 M74	AAC-3’ GGT-3’
E31 M75	AAA-3’ GTA-3’
E32 M75	AAC-3’ GTA-3’
E31 M78	AAA-3’ GTT-3’
E32 M78	AAC-3’ GTT-3’
E39 M74	AGA-3’ GGT-3’
E42 M74	ATG-3’ GGT-3’
E39 M75	AGA-3’ GTA-3’
E42 M75	ATG-3’ GTA-3’
E39 M78	AGA-3’ GTT-3’
E42 M78	ATG-3’ GTT-3’
E02 M03 Kombinasyonunda Kullanılanlar	
E47 M66	CAA-3’ GAT-3’
E49 M66	CAG-3’ GAT-3’
E47 M67	CAA-3’ GCA-3’

E49 M67	CAG-3’ GCA-3’
E47 M69	CAA-3’ GCG-3’
E49 M69	CAG-3’ GCG-3’
E47 M71	CAA-3’ GGA-3’
E49 M71	CAG-3’ GGA-3’
E47 M74	CAA-3’ GGT-3’
E49 M74	CAG-3’ GGT-3’
E47 M75	CAA-3’ GTA-3’
E49 M75	CAG-3’ GTA-3’
E47 M63	CAA-3’ GAA-3’
E49 M63	CAG-3’ GAA-3’
E47 M64	CAA-3’ GAC-3’
E49 M64	CAG-3’ GAC-3’
E47 M68	CAA-3’ GCC-3’
E49 M68	CAG-3’ GCC-3’
E47 M78	CAA-3’ GTT-3’
E49 M78	CAG-3’ GTT-3’
E47 M79	CAA-3’ TAA-3’
E49 M79	CAG-3’ TAA-3’
E47 M80	CAA-3’ TAC-3’
E49 M80	CAG-3’ TAC-3’
E55 M78	CGA-3’ GTT-3’
E56 M78	CGC-3’ GTT-3’
E55 M79	CGA-3’ TAA-3’
E56 M79	CGC-3’ TAA-3’
E55 M80	CGA-3’ TAC-3’
E56 M80	CGC-3’ TAC-3’
E55 M63	CGA-3’ GAA-3’
E56 M63	CGC-3’ GAA-3’
E55 M66	CGA-3’ GAT-3’
E56 M66	CGC-3’ GAT-3’

E55 M67	CGA-3’ GCA-3’
E56 M67	CGC-3’ GCA-3’
E55 M71	CGA-3’ GGA-3’
E56 M71	CGC-3’ GGA-3’
E55 M74	CGA-3’ GGT-3’
E56 M74	CGC-3’ GGT-3’
E55 M75	CGA-3’ GTA-3’
E56 M75	CGC-3’ GTA-3’
E51 M63	CCA-3’ GAA-3’
E52 M63	CCC-3’ GAA-3’
E51 M66	CCA-3’ GAT-3’
E52 M66	CCC-3’ GAT-3’
E51 M67	CCA-3’ GCA-3’
E52 M67	CCC-3’ GCA-3’
E51 M78	CCA-3’ GTT-3’
E52 M78	CCC-3’ GTT-3’
E51 M79	CCA-3’ TAA-3’
E52 M79	CCC-3’ TAA-3’
E51 M80	CCA-3’ TAC-3’
E52 M80	CCC-3’ TAC-3’
E55 M64	CGA-3’ GAC-3’
E56 M64	CGC-3’ GAC-3’
E55 M68	CGA-3’ GCC-3’
E56 M68	CGC-3’ GCC-3’
E55 M69	CGA-3’ GCG-3’
E56 M69	CGC-3’ GCG-3’
E57 M63	CGG-3’ GAA-3’
E58 M63	CGT-3’ GAA-3’
E57 M64	CGG-3’ GAC-3’
E58 M64	CGT-3’ GAC-3’
E57 M67	CGG-3’ GCA-3’

E58 M67	CGT-3’ GCA-3’
E57 M69	CGG-3’ GCG-3’
E58 M69	CGT-3’ GCG-3’
E57 M71	CGG-3’ GGA-3’
E58 M71	CGT-3’ GGA-3’
E57 M74	CGG-3’ GGT-3’
E58 M74	CGT-3’ GGT-3’
E57 M68	CGG-3’ GCC-3’
E58 M68	CGT-3’ GCC-3’
E57 M79	CGG-3’ TAA-3’
E58 M79	CGT-3’ TAA-3’
E57 M80	CGG-3’ TAC-3’
E58 M80	CGT-3’ TAC-3’

3.2.3.4.6. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

25 cm % 8’lik poliakrilamid jel (Long Ranger, FMC Biozym) Çizelge 3.11’de verilen formüle göre hazırlanmıştır. Çizelge 3.11’de verilen karışım hazırlandıktan hemen sonra, daha önceden hazırlanan cam plakalar arasına şırınga ile enjekte edilmiş ve hemen ardından örneklerin yükleneceği tarak (48’lik veya 64’lük) yerleştirilmiştir. 1 saat boyunca katılaşmaya bırakılan jel daha sonra temizlenmiş ve elektroforez işleminin yapıldığı LI-COR DNA GeneReadir 4200 (MWG Biotech. Ebersberg/Germany) cihazına yerleştirilmiştir. 10 X TBE (324 g Tris, 55 g Borik asit, 18.6 g EDTA bidistile su ile 2 lt’ye tamamlanır) tamponundan seyreltilen 1 X TBE çözeltisi elektrot tampon çözeltisi olarak kullanılmıştır. 1500 V, 40 W, 35 mA ve 48°C değerleri kullanılarak jel 20 dakikalık bir ön ısıtmaya tabi tutulmuştur.

PCR'dan çıkan örneklere eşit hacimde (20 µl) formamide yükleme tamponu [% 96 formamide (v/v), 10 mM EDTA pH 8.0, % 0.1 fuchsin] eklenmiş ve daha sonra 94°C'de 1.5 dakika denatürasyonları sağlanmıştır. Kullanılan tarak tipine bağlı olarak 0.5 ile 1.5 µl miktarları arasında örnekler jele yüklenmiştir. Bantların değerlendirilmesi için Şekil 3.3'de gösterilen IRDye 50-700 bp'lik standart DNA kullanılmıştır. Bir jele birden fazla yükleme yapılmıştır. Saga^{MX} yazılım programı kullanılarak elde edilen bant şablonları doğrudan bilgisayara aktarılmıştır.

Çizelge 3.10. % 8'lik Long Ranger solüsyonunun hazırlanışı.

Üre	84 g
10 X TBE	20 ml
Long Ranger (% 50)	32 ml
H_2 O	200 ml'ye tamamla

Çizelge 3.11. Poliakrilamid jel bileşenleri ve miktarları.

% 8'lik Long Ranger	25 ml
TEMED	25 µl
APS	180 µl
DMSO	250 µl

3.2.3.4.7. Dayanıklı Yakın İzogenik Hatlarda AFLP Analizleri

Araştırmanın AFLP analizleri kısmında DNA materyali olarak CIMMYT'den temin edilen dayanıklı yakın izogenik hatlardan oluşturulan DNA ve DNA bulkları kullanılmıştı. DNA ve DNA bulklarında polimorfik bant deseni sergileyen 28 AFLP primer kombinasyonu (Çizelge 3.12) bu bölümde 41 adet dayanıklı hatta incelenmiştir. DNA ve DNA bulklarında elde edilen polimorfizm 3. DNA (12 No'lu hat-*Lr13*)'da bir bandın gözlenmesi ancak diğer DNA ve bulklarda söz konusu bu bandın gözlenmemesini belirtmektedir. Bu nedenle polimorfik bant veren primer kombinasyonları bu anlamda seçilmiştir. Bu primer kombinasyonlarının dayanıklı hatlarda incelenmesinin nedeni ise; bulklarda yer alan herhangi bir dayanıklı hat, 3. DNA'nın vermiş olduğu polimorfik bant desenine sahip olabilir ancak bu hat bir bulkda yer aldığı için bu bant desenini göremeyebiliriz.

Bu bölümdeki AFLP analizleri, kullanılan yöntem ve metodlar bir önceki bölümde açıklandığı gibi uygulanmıştır.

Çizelge 3.12. 41 dayanıklı hatta +3 amplifikasyonunda kullanılan AFLP primer kombinasyonları.

AFLP Primer Kombinasyonları	
E32 M53	E43 M75
E32 M56	E32 M74
E39 M57	E49 M67
E31 M56	E47 M69
E33 M63	E47 M68

E32 M63	E49 M68
E41 M70	E51 M63
E34 M70	E52 M63
E32 M69	E51 M80
E45 M66	E56 M71
E34 M71	E47 M64
E45 M67	E58 M67
E45 M68	E57 M69
E43 M74	E57 M74

3.2.3.5. SSR Markörleri

Çalışmanın bu kısmında 41 adet kahverengi pasa dayanıklı yakın izogenik hatta ve bunlardan oluşturulan DNA ve DNA bulklarında bazı SSR primerleri incelenmiştir. Öncelikle dayanıklı yakın izogenik hatlarda birkaç SSR primeri denenmiş ancak genellikle bütün hatlarda aynı bant şablonu elde edilmiştir. Bu nedenle aynen AFLP markörlerinde olduğu gibi doğrudan *Lr13* dayanıklılık genine ait markörün saptanması amacıyla öncelikle DNA ve DNA bulkları, "İzmir 85 x 12 no'lu hat" melezinin F_1 generasyonu ve ebeveynleri SSR primerleriyle araştırılmıştır. Bu primerler Seyfarth et al., (2000a)'un çalışmasından yararlanılarak kullanılan Wms 120, Wms 319, Wms 388 ve Wms 630 (MWG Biotech.) primerleridir (Çizelge 3.13). Ayrıca sadece dayanıklı hatlarda Wmc 104, Wmc 167 ve Wmc 177 primerleri de incelenmiştir (Çizelge 3.13).

Çizelge 3.13. SSR primerleri ve baz dizilişleri.

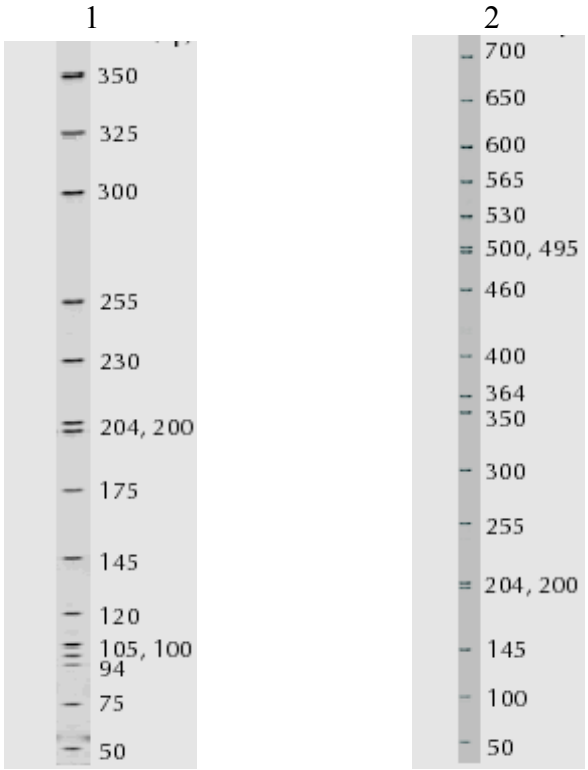
SSR	Forward Primer	Reverse Primer	Lokasyonu
Wms120	GATCCACCTTCCTCTCTCTC	GATTATACTGGTGCCGAAAC	2B
Wms319	GGTTGCTGTACAAGTGTTCACG	CGGGTGCTGTGTGTAATGAC	2B
Wms388	CTACAATTCGAAGGAGAGGGG	CACCGCGTCAACTACTTAAGC	2B
Wms630	GTGCCTGTGCCATCGTC	CGAAAGTAACAGCGCAGTGA	2B
Wmc104	TCTCCCTCATTAGAGTTGTCCA	ATGCAAGTTTAGAGCAACACCA	6B
Wmc167	AGTGGTAATGAGGTGAAAGAAG	TCGGTCGTATATGCATGTAAAG	2D
Wmc177	AGGGCTCTCTTTAATTCTTGCT	GGTCTATCGTAATCCACCTGTA	2A

PCR işleminde Somers et. al. (2004)'un yöntemi kullanılmıştır. Toplam 15 µl reaksiyon hacminde; 50 ng DNA, 1 X PCR buffer (Eppendorf Brinkmann Ins. USA), 0.2 mM dNTP (PeQlab Biotech. GmbH), 0.7 mM $Mg(OAc)_2$ (Eppendorf Brinkmann Ins. USA), 0.75 ng F-Primer, 0.75 ng R-primer, 0.75 ng M13 (MWG Biotech.) ve 0.5 ünite Taq Polimeraz enzimi (Eppendorf Brinkmann Ins. USA) yer almıştır. Kullanılan SSR primerlerinde de F-Primerler 5'-ucunda floresan boya IRD700 veya IRD800 (MWG Biotech.) ile işaretlenmiştir.

PCR amplifikasyonu thermocycler (GeneAmp PCR System 9700, Perkin Elmer) cihazında, başlangıç denatürasyonundan (95°C'de 3 dak.) sonra 94°C'de 40 saniye, 60°C'de 30 saniye, 72°C'de 45 saniye olacak şekilde 35 döngüden ve son sentez devresinden (72°C'de 10 dak.) oluşmuştur.

PCR amplifikasyonundan sonra örneklere eşit hacimde formamide

yükleme tamponu eklenmiş ve 94 °C'de 1.5 dakika denatürasyonları sağlanmıştır. Bundan sonraki işlemler AFLP markörlerinin araştırılmasında olduğu gibi uygulanmıştır. 25 cm % 8'lik poliakrilamid jele 0.5-1.5 µl miktarları arasında örnekler yüklenmiş ve ayrıca standart DNA olarak Şekil 3.3'de gösterilen IRDye 50-350 bp kullanılmıştır. Elektrot tampon çözeltisi olarak 1 X TBE'den yararlanılmış ve 1500 V, 40 W, 35 mA ve 48°C değerlerinde LI-COR DNA GeneReadir 4200 (MWG Biotech. Ebersberg/Germany) cihazında elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bant şablonları Saga^{MX} yazılım programı kullanılarak doğrudan bilgisayara aktarılmıştır.



Şekil 3.3. SSR ve AFLP analizlerinde kullanılan standart DNA'lar;
1. IRDye 50-350, 2. IRDye 50-700.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

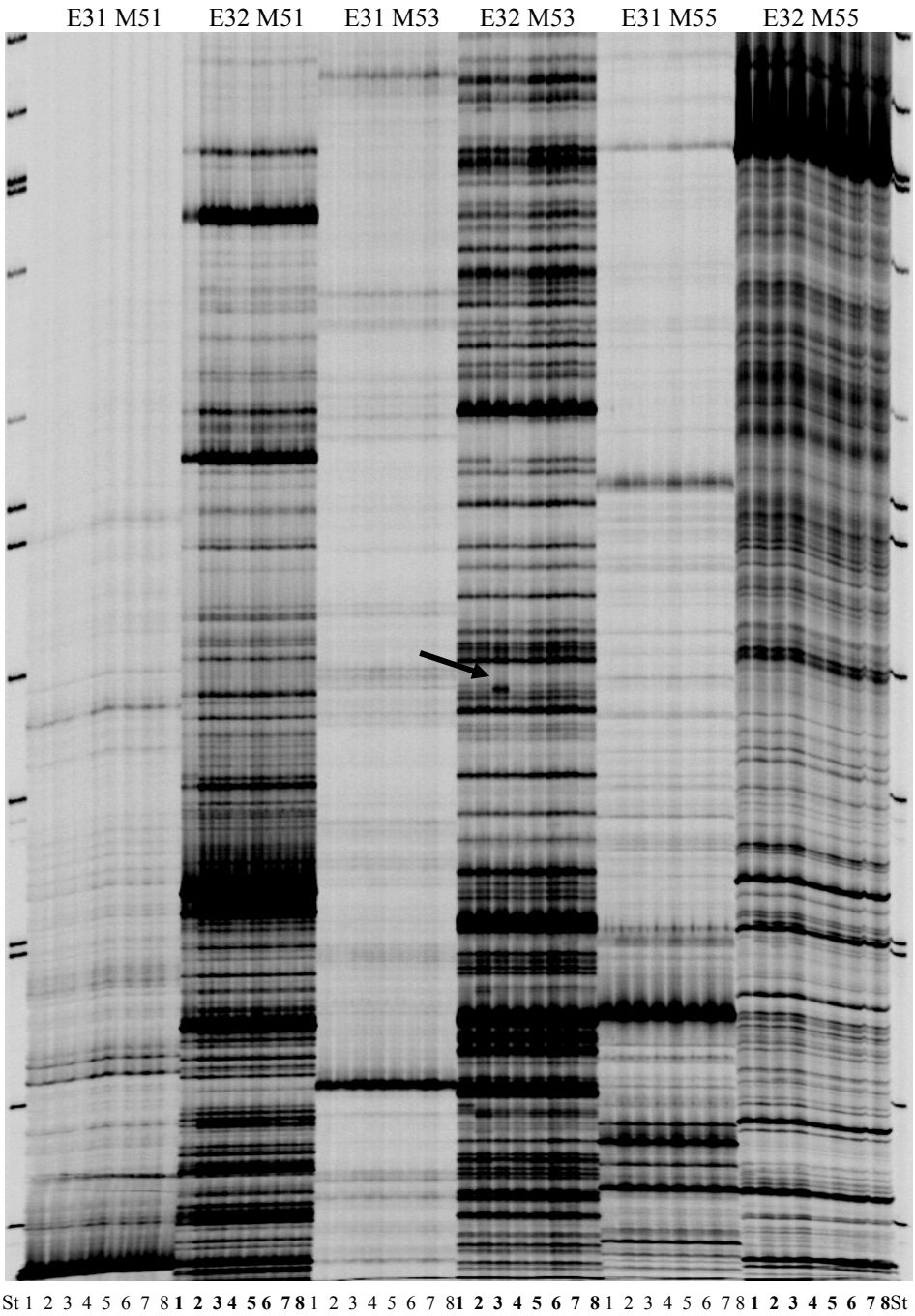
4.1. AFLP Analizlerine Ait Bulgular

Lr13 dayanıklılık genine ait moleküler markörleri saptamak amacıyla yakın izogenik hatlardan oluşturulan DNA ve DNA bulklarında toplam 246 farklı AFLP primer kombinasyonu incelenmiştir. Her primer kombinasyonunda incelenen 8 örnek, materyal ve metotta belirtilen DNA ve DNA bulklarının (Çizelge 3.5) bant desenleridir. AFLP primer kombinasyonlarının büyük bir kısmının bant desenleri Şekil 4.1 ile 4.109 arasında verilmiştir. İncelenen bu primerlerden bazıları *Lr13*'ü taşıyan 12 No'lu hatta polimorfizm göstermiştir. 12 No'lu hat DNA ve DNA bulklarının incelendiği şekillerde 3. örnektir. İncelenen polimorfizm ise 3. örnekte gözlenen bir bandın diğer DNA ve DNA bulklarında bulunmamasıdır.

Bu şekilde 3. örnekte yani 12 No'lu hatta polimorfik bant veren primer kombinasyonları bulkların oluşturulduğu Thatcher yakın izogenik hatlarında da incelenmiş ve şekilleri yine bu bölümde verilmiştir.

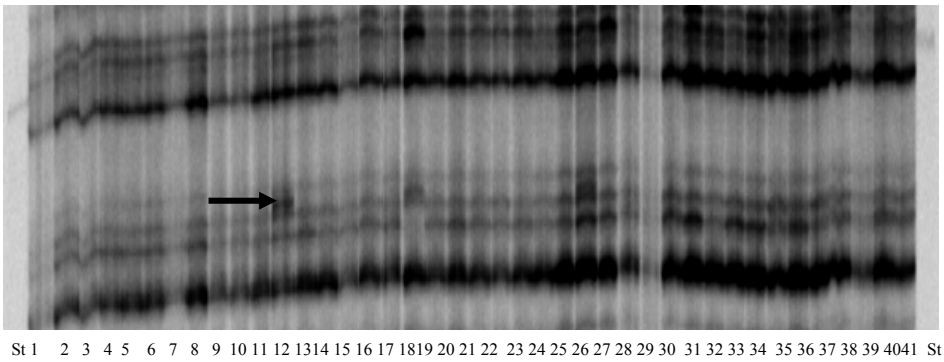
İlk aşamada DNA ve DNA bulklarında 6 farklı primer kombinasyonunun vermiş olduğu bant desenleri gösterilmiştir (Örneğin Şekil 4.1). Bunlar arasında polimorfik bant veren primer kombinasyonu daha sonra o polimorfik bandın bulunduğu yer bakımından büyütülerek tekrar verilmiştir (Örneğin Şekil 4.3).

Duyarlı ebeveyn İzmir 85 ile dayanıklı ebeveyn 12 No'lu hat ve bunlar arasında yapılan melezin F_1 generasyonunda da polimorfizm oluşturan primer kombinasyonları incelenmiş ve bunlarda oluşturdukları bant desenleri gösterilmiştir.



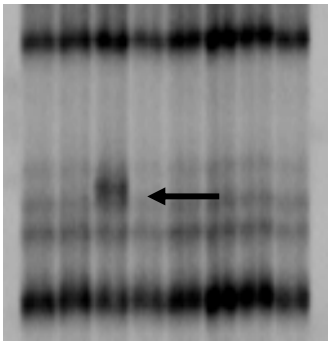
Şekil 4.1. E31-E32 primerlerinin M51-M53-M55 ile kombinasyonu.

Şekil 4.1'de DNA ve DNA bulklarında E31-E32 primerlerinin M51-M53-M55 ile kombinasyonunun sonuçları görülmektedir. Bu primer kombinasyonlarından E32 M53 kombinasyonu standart DNA'nın 255-300 bp değerleri arasında polimorfik bir bant deseni vermiştir. Polimorfik bant sadece 12 No'lu hattın (*Lr13*) bulunduğu 3. örnekte gözlenmiş diğer örneklerde saptanmamıştır. Bu polimorfik bandın *Lr13* ile ilişkisi olup olmadığını incelemek amacıyla E32 M53 primer kombinasyonu dayanıklı yakın izogenik hatlarda incelenmiştir.



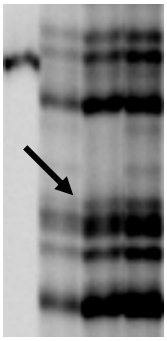
Şekil 4.2. E32 M53 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları.

Şekil 4.2'de E32 M53 primer kombinasyonunun Thatcher yakın izogenik hatlarında sonuçları görülmektedir. Söz konusu polimorfik bant 12 No'lu hat ile birlikte 18 ve 26 No'lu hatlarda da gözlenmiştir. Diğer dayanıklı hatlarda bu bant saptanmamıştır.

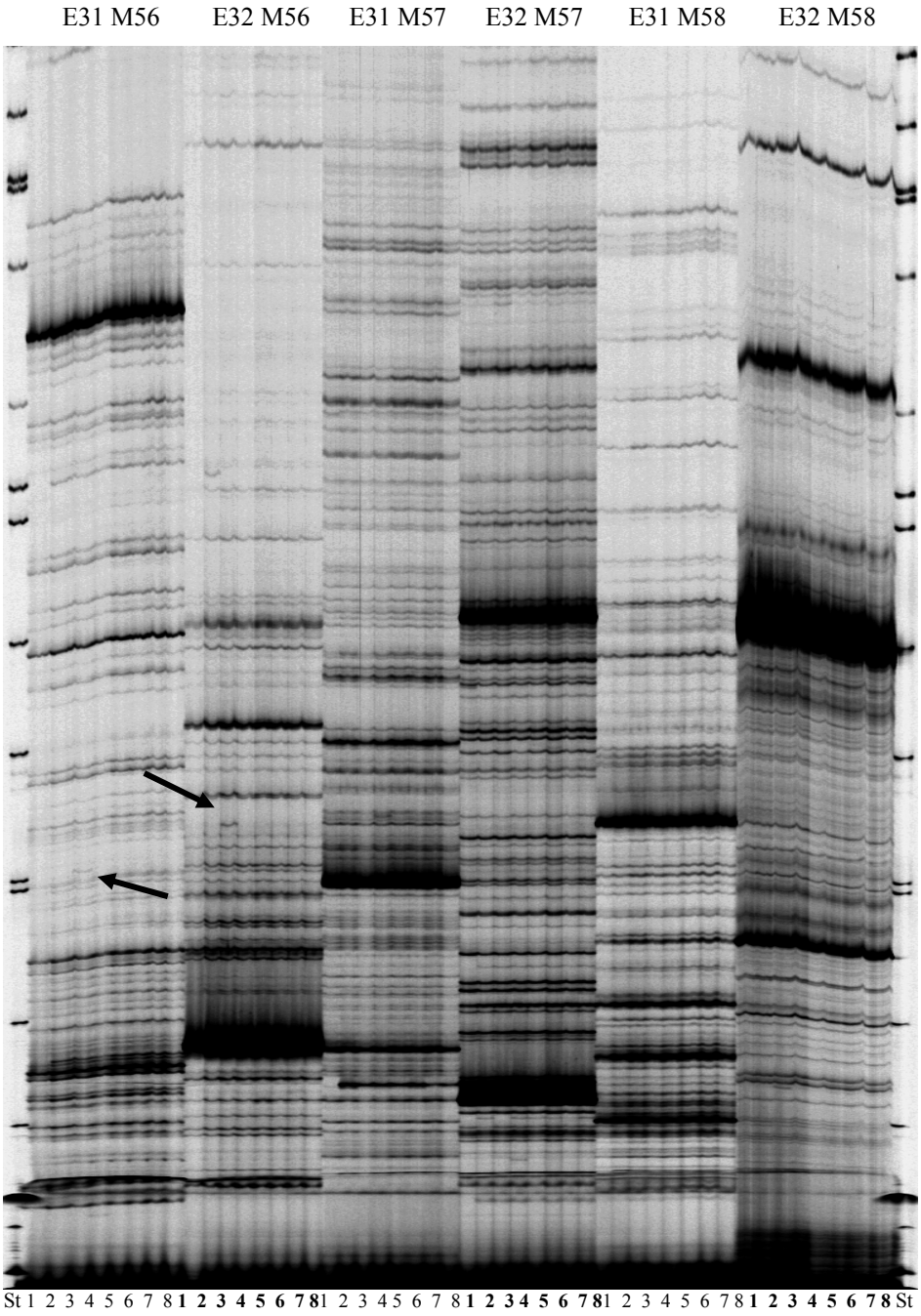


Şekil 4.3. E32 M53 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.

Şekil 4.3'de E32 M53 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında göstermiş olduğu polimorfik bant daha açık bir şekilde görülmektedir. Şekil 4.4'de aynı primer kombinasyonunun İzmir-85, 12 No'lu hat ve F_1'de vermiş olduğu bant şablonu da görülmektedir. Söz konusu polimorfik bant ebeveynler ile F_1'de monomorfik olarak gözlenmiştir.

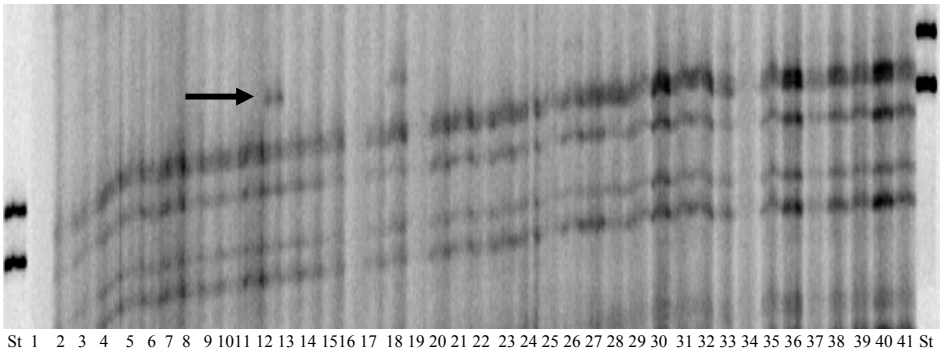


Şekil 4.4. E32 M53 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.



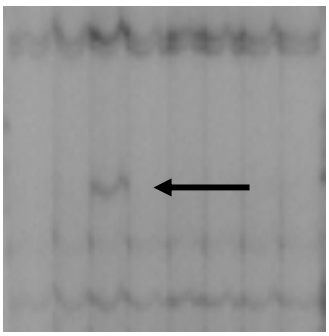
Şekil 4.5. E31-E32 primerlerinin M56-M57-M58 ile kombinasyonu.

Şekil 4.5'de DNA ve DNA bulklarında E31-E32 primerlerinin M56-M57-M58 ile kombinasyonlarının sonuçları görülmektedir. E31 M56 ve E32 M56 primer kombinasyonları sırasıyla 204 ve 204-255 bp değerleri arasında iki farklı polimorfik bant vermişlerdir. Polimorfik bantlar belirgin bir şekilde sadece 3. örnekte (12 No'lu hat) gözlenmiştir.



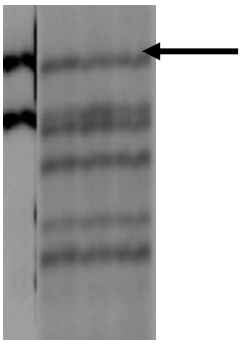
Şekil 4.6. E31 M56 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları.

E31 M56 primer kombinasyonunu dayanıklı hatlarda incelenmiş ve sonuçları Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Beklenen polimorfik bant 12 ve 18 No'lu hatta belirgin, 26 No'lu hatta silik bir şekilde gözlenmiştir.

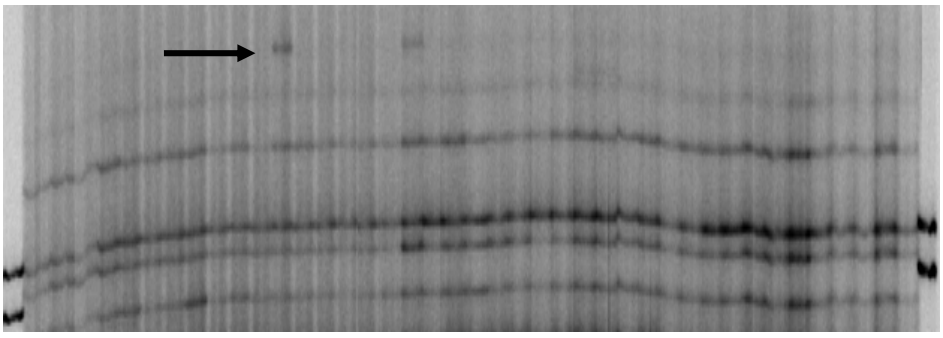


Şekil 4.7. E31 M56 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.

Şekil 4.7'de E31 M56 AFLP primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında vermiş olduğu bant şablonu görülmektedir. Şekil 4.8'de ise aynı kombinasyon İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların F_1'inde incelenmiş ve söz konusu bant ebeveynlerle birlikte F_1'de de elde edilmiş ve monomorfik bir bant olarak dikkate alınmıştır.

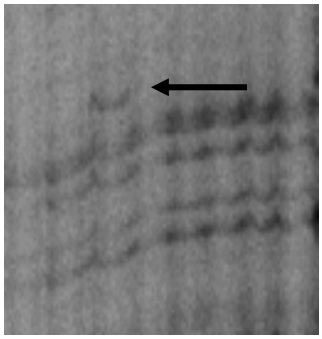


Şekil 4.8. E31 M56 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.



Şekil 4.9. E32 M56 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları.

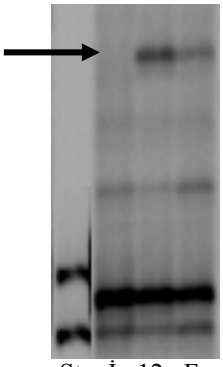
DNA ve DNA bulklarında polimorfik bant veren diğer bir primer kombinasyonu E32 M56 primerinin dayanıklı hatlardaki sonuçları Şekil 4.9'da verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi polimorfik bant 12 No'lu hat ve 18 No'lu hatta gözlenmiş diğer hatlarda elde edilmemiştir.



1 2 3 4 5 6 7 8

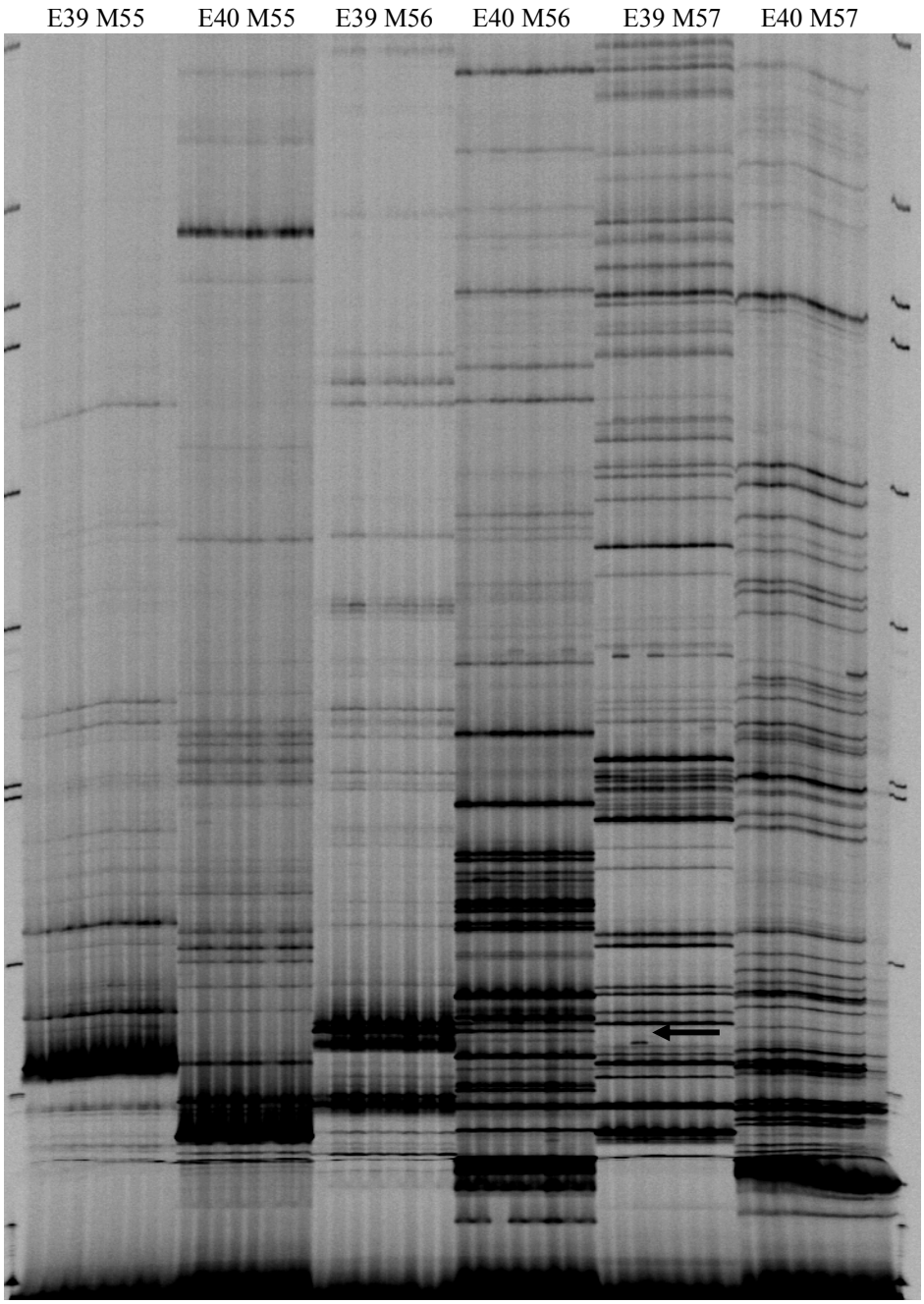
Şekil 4.10. E32 M56 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.

Şekil 4.10'da E32 M56 AFLP primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında göstermiş olduğu bant deseni daha yakından görülmektedir. Şekilden de anlaşıldığı gibi 3. örnekte bir bant görülmekte ve aynı bant diğer DNA veya DNA bulklarında bulunmamaktadır.



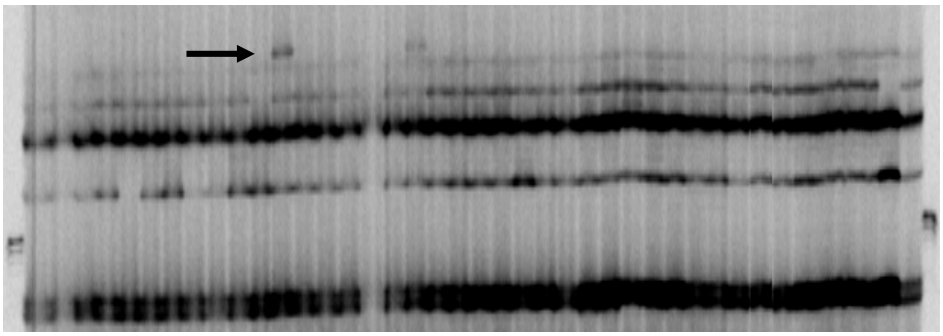
Şekil 4.11. E32 M56 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.

Şekil 4.11'de E32 M56 primer kombinasyonunun duyarlı ebeveyn İzmir 85, dayanıklı ebeveyn 12 No'lu hat ve bunların F_1'de vermiş olduğu bant desenleri görülmektedir. 12 No'lu hat ve F_1'de söz konusu polimorfik bant elde edilmiş, İzmir 85'de görülmemiştir. Diğer bir deyişle bu bant bakımından ebeveynler farklılık göstermiş, F_1'de ise bant elde edilmiştir.



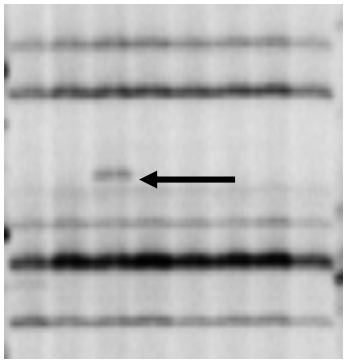
Şekil 4.12. E39-E40 primerlerinin M55-M56-M57 ile kombinasyonu.

E39-E40 primerlerinin M55-M56-M57 ile kombinasyonu DNA ve DNA bulklarında incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.12'de gösterilmiştir. Bunlar arasından E39 M57 kombinasyonu 100-145 bp standartları arasında belirgin bir polimorfik bant vermiştir.



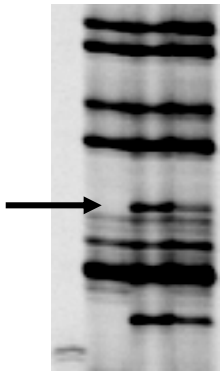
Şekil 4.13. E39 M57 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları.

Polimorfik bant deseni veren E39 M57 primer kombinasyonu Thatcher yakın izogenik hatlarında incelenmiştir (Şekil 4.13). Polimorfik bant 12 No'lu hatla birlikte 18 No'lu hatta da gözlenmiştir.



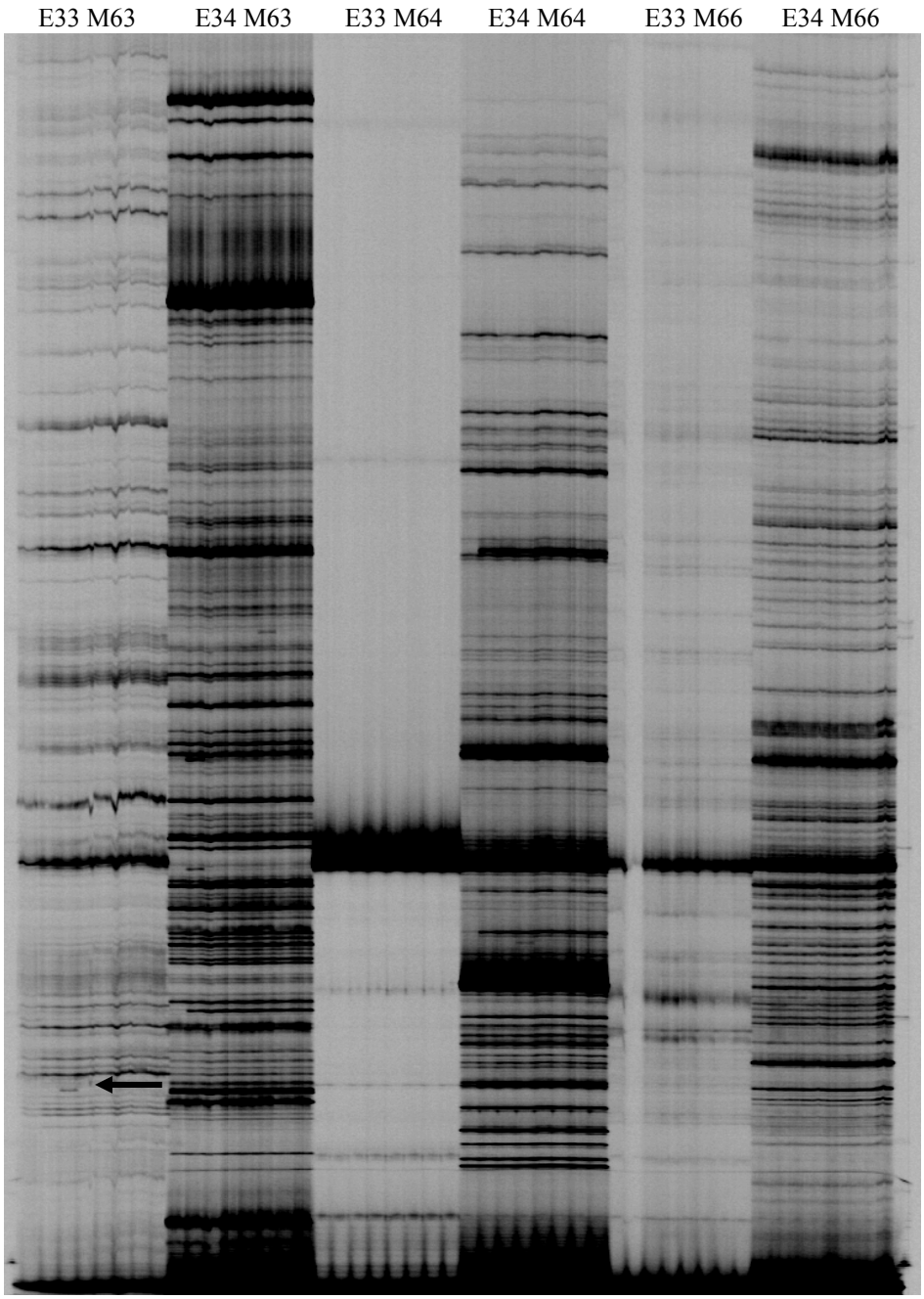
Şekil 4.14. E39 M57 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.

E39 M57 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında vermiş olduğu sonuçlar Şekil 4.14'de gösterilmiştir. 3. örnek diğer DNA veya DNA bulklarında olmayan bir banda sahiptir ve bu bant Şekil 4.14'de net bir şekilde görülmektedir. Aynı primer kombinasyonu İzmir 85 ile 12 No'lu hatta ve bunların F_1'inde incelenmiş elde edilen sonuçlar Şekil 4.15'de verilmiştir. Araştırılan polimorfik bandın ebeveynlerde de polimorfik olduğu gözlenmiştir. İzmir 85'de gözlenmeyen bant İzmir 85 ile 12 No'lu hat arasında yapılan melezin F_1'inde ise elde edilmiştir.



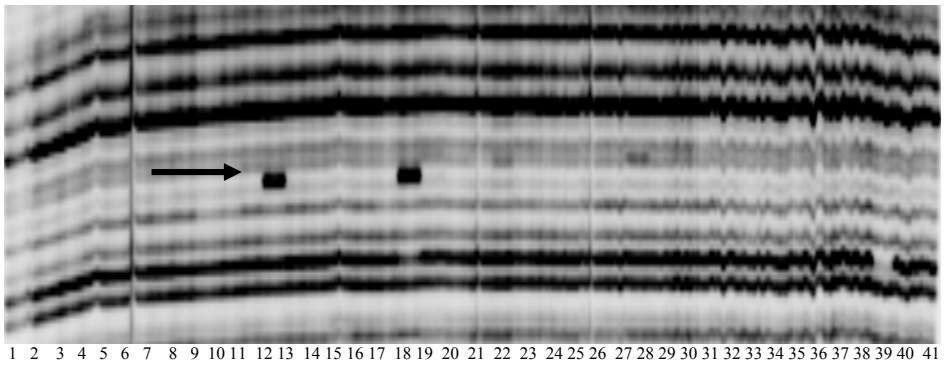
St İ 12 F_1

Şekil 4.15. E39 M57 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.



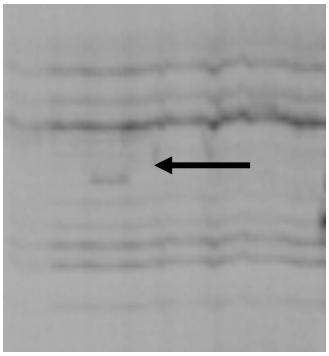
Şekil 4.16. E33-E34 primerlerinin M63-M64-M66 ile kombinasyonu.

DNA ve DNA bulklarında incelenen AFLP primerleri arasında E33-E34 primerlerinin M63-M64-M66 ile kombinasyon sonuçları Şekil 4.16'da verilmiştir. E33 primeri ile M63 primerinin kombinasyonu 50-100 bp değerleri arasında polimorfik bir bant göstermiştir. *Lr13*'ü taşıyan 12 No'lu hatta (3. örnek) polimorfik bant açık bir şekilde gözlenmektedir.



Şekil 4.17. E33 M63 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları.

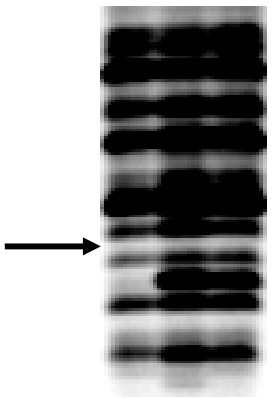
DNA ve DNA bulklarında polimorfik bant veren E33 M63 primer kombinasyonu dayanıklı hatlarda da ayrı ayrı incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.17'de verilmiştir. Sadece 12 No'lu hatta beklenen polimorfik bant 18 No'lu hatta da net bir şekilde gözlenmiştir.



1 2 3 4 5 6 7 8

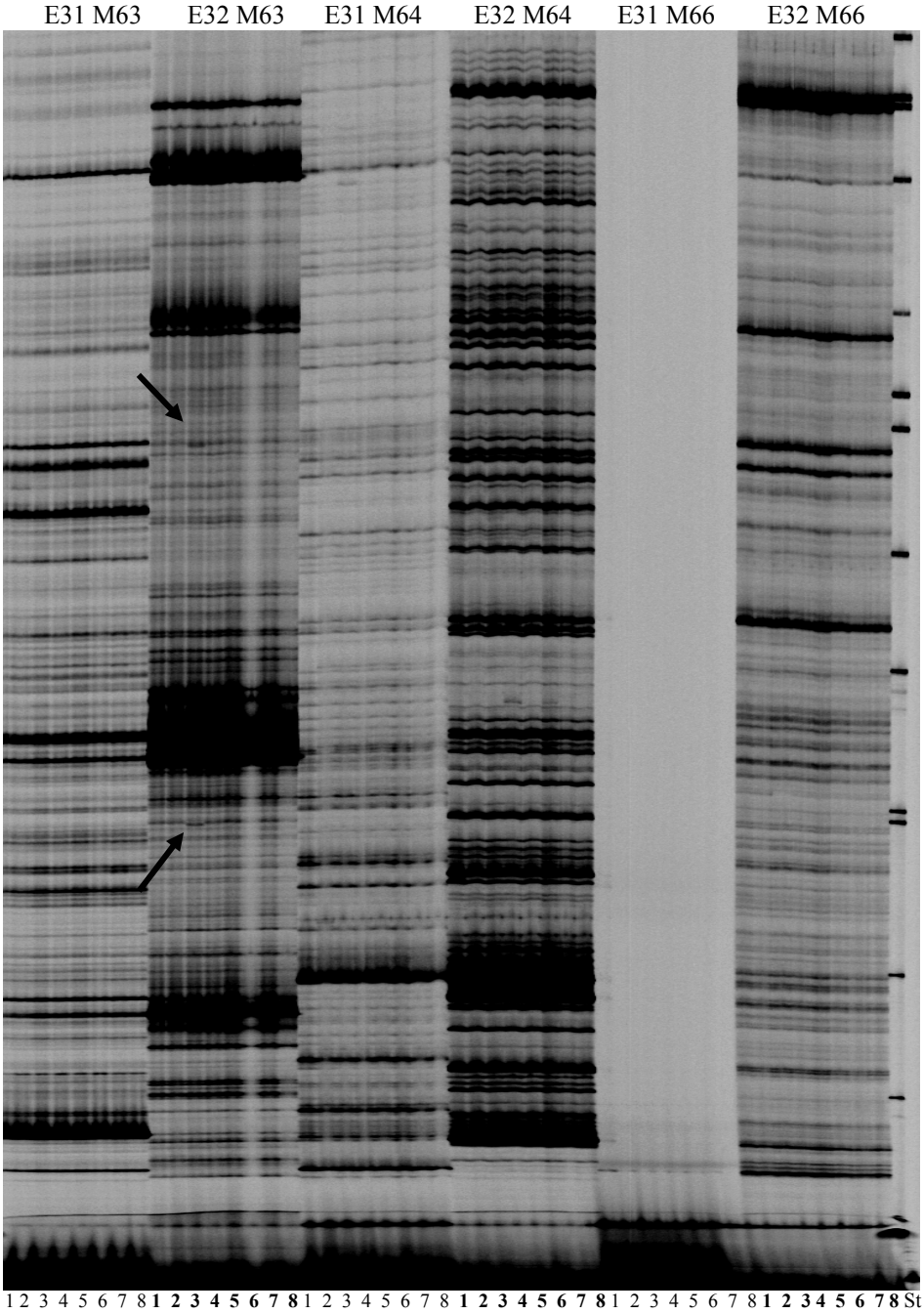
Şekil 4.18. E33 M63 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.

Şekil 4.18'de E33 M63 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında, Şekil 4.19'da ise İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların F_1'inde vermiş olduğu bant şablonları görülmektedir. Bulklarda polimorfik bir bant deseni sergileyen primer kombinasyonu ebeveynlerle birlikte F_1'de monomorfik olarak gözlenmiştir.



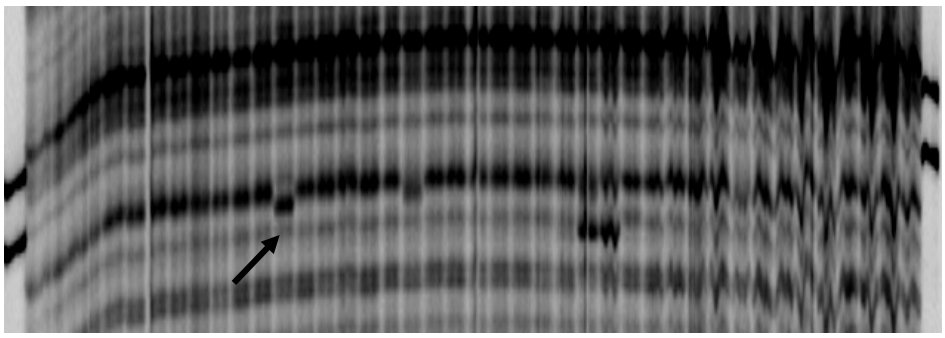
İ 12 F_1

Şekil 4.19. E33 M63 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.



Şekil 4.20. E31-E32 primerlerinin M63-M64-M66 ile kombinasyonu.

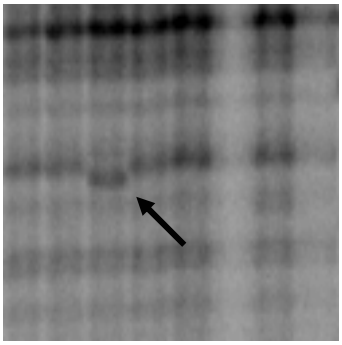
Şekil 4.20'de E31 M63, E32 M63, E31 M64, E32 M64, E31 M66 ve E32 M66 primer kombinasyonlarının DNA ve DNA bulklarında vermiş olduğu bant desenleri görülmektedir. Bunlardan E32 M63 primer kombinasyonu iki farklı polimorfik bant göstermiştir. Polimorfik bantlardan birincisi 200-204 bp, ikincisi ise 300-350 bp standart değerleri arasında gözlenmiştir. Bu primer her iki polimorfik bant bakımından dayanıklı hatlarda ve ebeveynler ile F_1'de tekrar incelenmiştir.



St 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38394041St

Şekil 4.21. E32 M63 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları (1. bant).

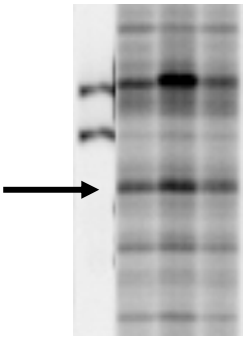
E32 M63 primer kombinasyonunun dayanıklı yakın izogenik hatlarda 200-204 bp standart DNA yakınlarında vermiş olduğu sonuçlar Şekil 4.21'de gösterilmiştir. Araştırılan polimorfik bant 12 No'lu ve 18 No'lu hatta gözlenmiştir. 12 No'lu hatta gözlenen polimorfik bandın hemen üstünde başka bir bant elde edilmiş ve bu bant 18 No'lu hatta gözlenmemiştir.



1 2 3 4 5 6 7 8

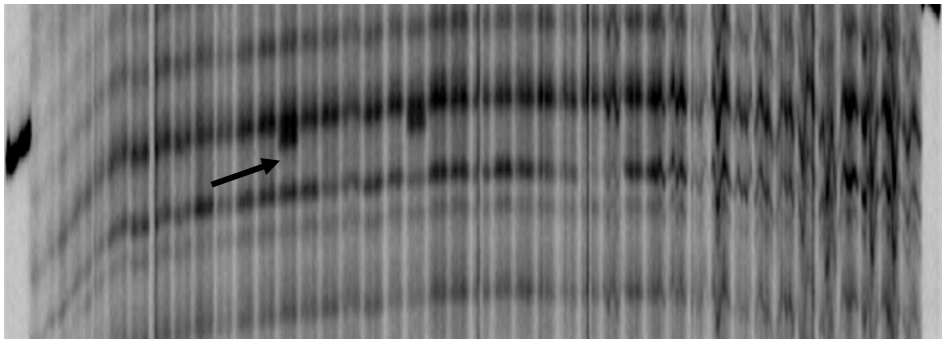
Şekil 4.22. E32 M63 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları (1. bant).

E32 M63 primer kombinasyonunun vermiş olduğu polimorfik bant daha açık bir şekilde 3. örnekte görülmektedir (Şekil 4.22). Aynı primer kombinasyonunun İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların F_1'de vermiş olduğu bant deseni Şekil 4.23'de gösterilmiştir. Bulklarda polimorfik olarak gözlenen bant ebeveynlerle birlikte F_1'de de elde edilmiş ve monomorfik olarak kabul edilmiştir.



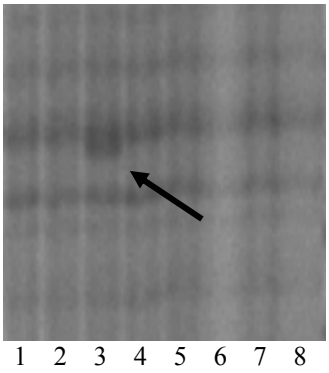
St İ 12 F_1

Şekil 4.23. E32 M63 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları (1. bant).



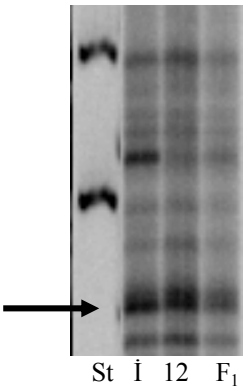
Şekil 4.24. E32 M63 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları (2. bant).

Şekil 4.24'de E32 M63 primer kombinasyonunun 300-350 bp değerleri arasında bulklarda vermiş olduğu polimorfik bant (2. bant) dayanıklı hatlarda incelenmiştir. Hatlar bu bant bakımında incelendiğinde; 12 No'lu hat ile 18 No'lu hat söz konusu banda sahiptirler. Diğer hatlarda bu bant gözlenmemiştir.

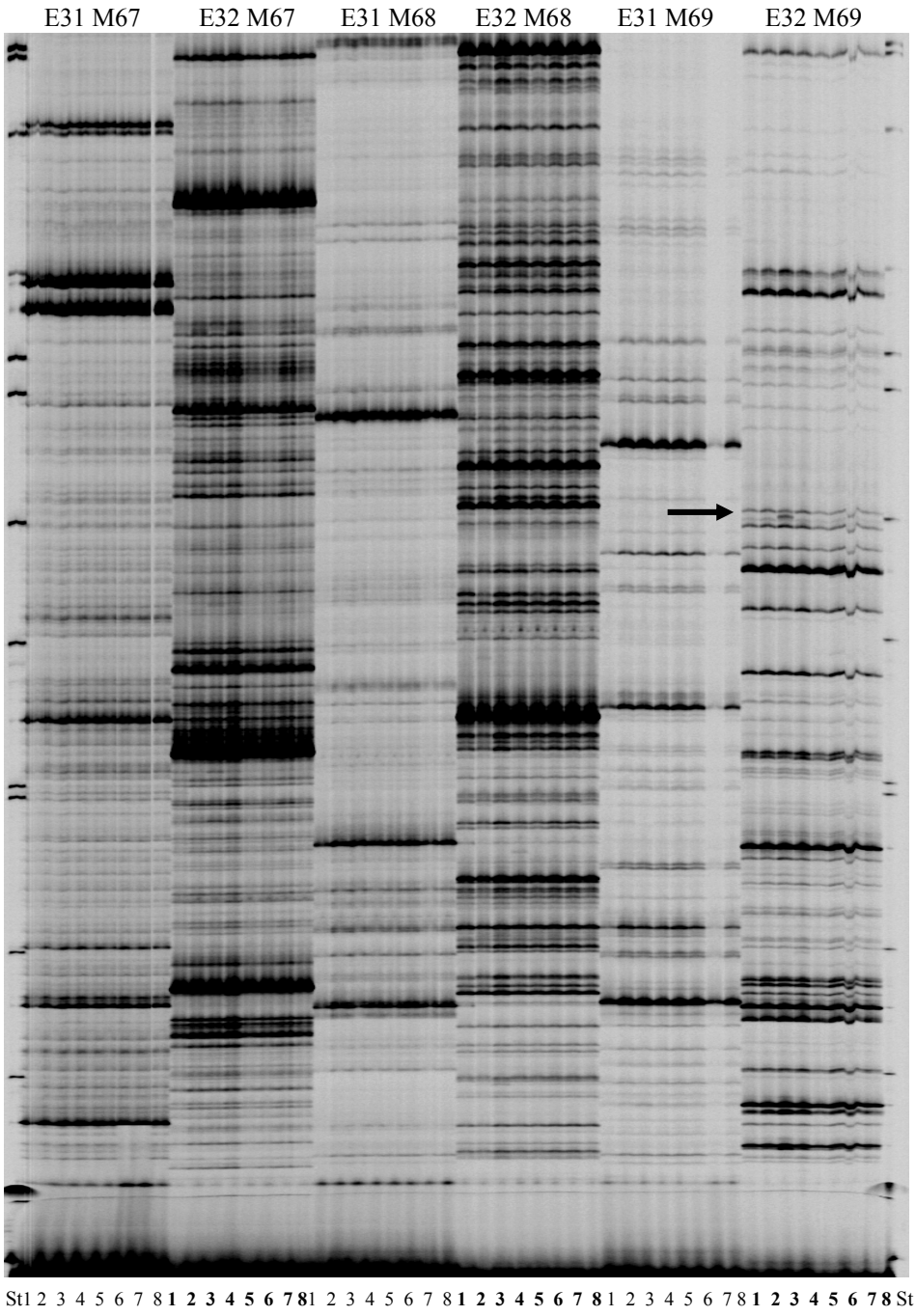


Şekil 4.25. E32 M63 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları (2. bant).

E32 M63 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında vermiş olduğu 2. polimorfik bant Şekil 4.25'de gösterilmiştir. Sadece 3. örnekte görülen bant diğer DNA veya DNA bulklarında saptanmamıştır. Aynı primer kombinasyonu ebeveynlerle birlikte F_1'de incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.26'da verilmiştir. Daha öncede belirtildiği gibi bulklarda polimorfik olarak belirlenen bant, İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların F_1'inde karşılaştırıldığında monomorfik olarak gözlenmiştir. Dolayısıyla bu bandın *Lr13* ile ilişkisi olmayan bir bant olduğu saptanmıştır.

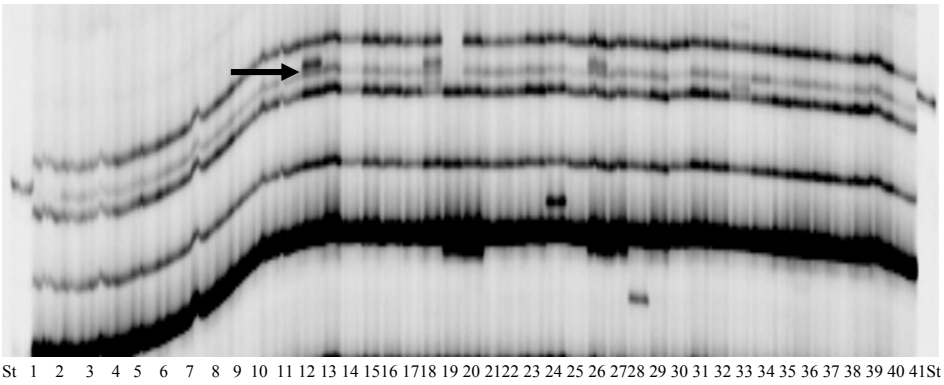


Şekil 4.26. E32 M63 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları (2. bant).



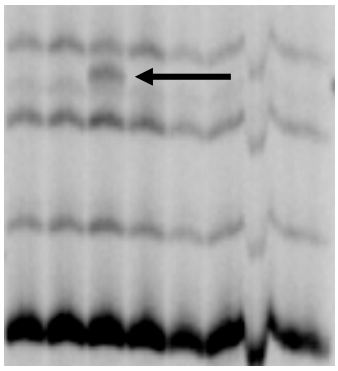
Şekil 4.27. E31-E32 primerlerinin M67-M68-M69 ile kombinasyonu.

Şekil 4.27'de sırasıyla E31 M67, E32 M67, E31 M68, E32 M68, E31 M69 ve E32 M69 primer kombinasyonlarının DNA ve DNA bulklarında vermiş oldukları bant şablonları görülmektedir. İncelenen primer kombinasyonlarından E32 M69 kombinasyonu yaklaşık 300 bp standardında polimorfik bir bant sergilemiştir. Çok net bir şekilde 12 No'lu hatta gözlenen bant diğer DNA ya da DNA bulklarında elde edilmemiştir.



Şekil 4.28. E32 M69 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları.

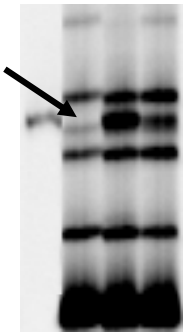
E32 M69 primer kombinasyonu dayanıklı hatlarda incelenmiştir (Şekil 4.28). Daha önceki polimorfik primerlerde olduğu gibi araştırılan bu bant da 12 No'lu hatla birlikte 18 ve 26 No'lu hatlarda da gözlenmiştir. İncelenen polimorfik bant diğer hatlarda gözlenmemiştir.



1 2 3 4 5 6 7 8

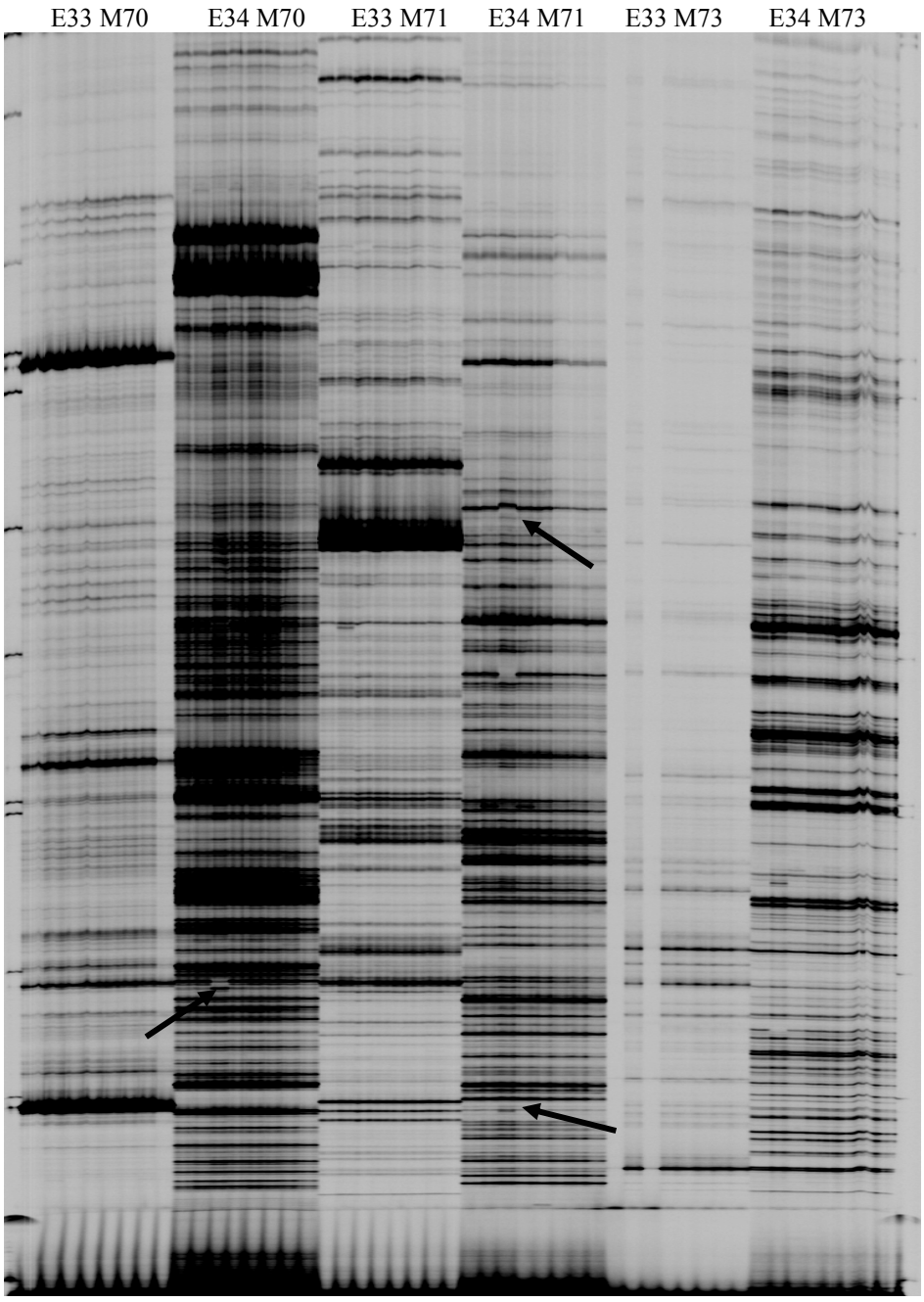
Şekil 4.29. E32 M69 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.

E32 M69 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarındaki sonuçları Şekil 4.29'da verilmiştir. Şekil 4.29 incelendiğinde 3. örnekte net bir şekilde polimorfik bant gözlenmektedir. Aynı banda İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların F_1'de bakıldığında (Şekil 4.30); 12 No'lu hat ile F_1'de bant çok kalın gözlenirken İzmir 85 çeşidinde ince bir bant elde edilmiştir. Bu nedenle elde edilen bu kalın polimorfik bandın yanında başka bir bant olduğu düşünülebilir.



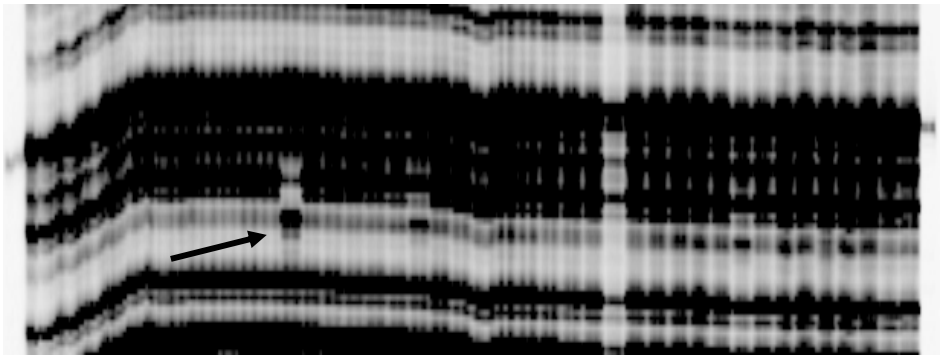
St İ 12 F_1

Şekil 4.30. E32 M69 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.



Şekil 4.31. E33-E34 primerlerinin M70-M71-M73 ile kombinasyonu.

DNA ve DNA bulklarında E33-E34 primerlerinin M70-M71-M73 ile kombinasyonu sonuçları Şekil 4.31'de verilmiştir. İncelenen primer kombinasyonlarından E34 M70 kombinasyonu 145 bp standardı yakınlarında polimorfik bir bant göstermiştir. Polimorfik bant veren diğer bir primer kombinasyonu E34 M71'dir. E34 M71 primer kombinasyonu ilk polimorfik bandı 100 bp, ikinci polimorfik bandı 300 bp standart DNA'ları civarlarında vermiştir (Şekil 4.31).

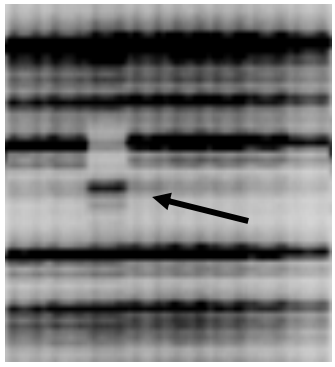


St 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 1516 1718 19 20 2122 23 24 25 26 2728 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41St

Şekil 4.32. E34 M70 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları.

E34 M70 primer kombinasyonu dayanıklı Thatcher yakın izogenik hatlarda incelenmiş ve araştırılan polimorfik bant bakımından sonuçları Şekil 4.32'de verilmiştir. Şekil 4.32 incelendiğinde; 12 No'lu hattın söz konusu polimorfik banda sahip olduğu, bu bandın hemen üstündeki banda ise sahip olmadığı görülmektedir. 12 No'lu hatta kalın bir şekilde saptanan bant diğer dayanıklı hatlarda da belirlenmiş ancak aynı yoğunlukta elde edilmemiştir. Ayrıca bu polimorfik bandın hemen altında, diğer hatlarda gözlenmeyen başka bir bant görülmektedir. *Lr13*

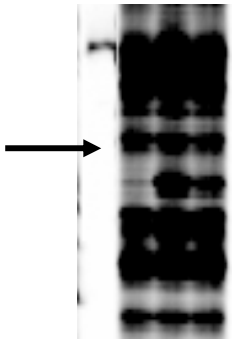
üzerinde yapılacak diğer çalışmalarda bu primer kombinasyonu üzerinde durulması yararlı olacaktır.



1 2 3 4 5 6 7 8

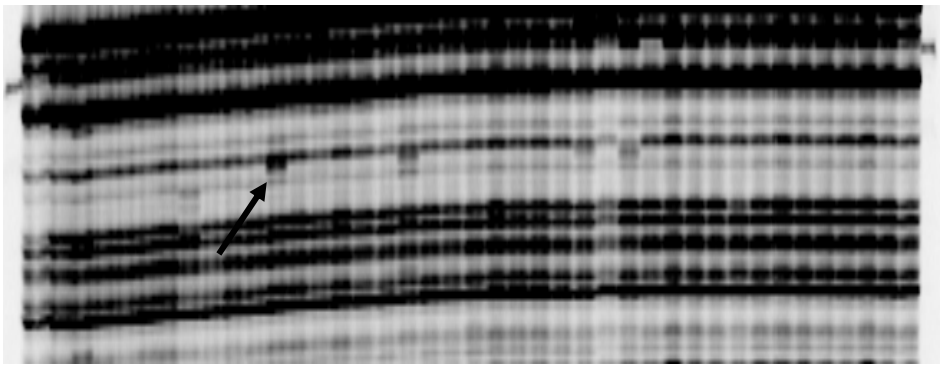
Şekil 4.33. E34 M70 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.

E34 M70 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında vermiş olduğu sonuçlar Şekil 4.33'de daha yakından gösterilmiştir. Şekil 4.34'de ise aynı kombinasyonun İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların F_1'inde vermiş olduğu bant desenleri görülmektedir. Söz konusu bant İzmir 85, 12 No'lu hat ve F_1'de incelendiğinde monomorfik olarak gözlenmiştir.



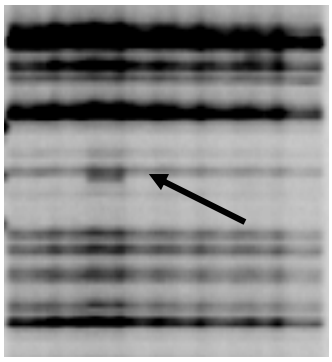
St İ 12 F_1

Şekil 4.34. E34 M70 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları



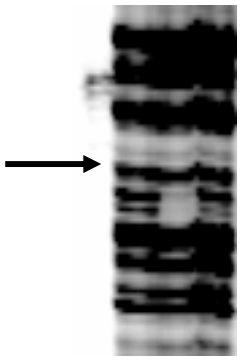
Şekil 4.35. E34 M71 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları (1. bant).

E34 M71 primer kombinasyonunun 100 bp standart DNA yakınlarında vermiş olduğu polimorfik bant dayanıklı yakın izogenik hatlarda Şekil 4.35'de görülmektedir. İncelenen polimorfik bant 12 No'lu hat ile birlikte 18 ve 28 No'lu hatlarda da saptanmıştır. Ancak 12 No'lu hatta daha belirgin bir şekilde görülmüştür.



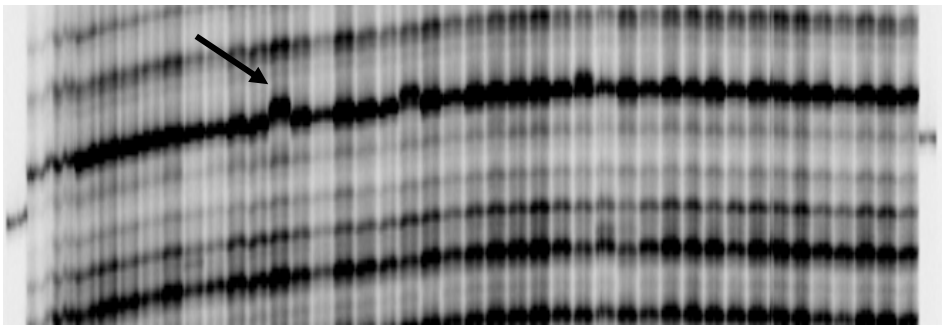
Şekil 4.36. E34 M71 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları (1. bant).

Şekil 4.36'da E34 M71 primer kombinasyonunun 100 bp standardı yakınlarında vermiş olduğu polimorfik bant DNA ve DNA bulklarında görülmektedir. Şekilde polimorfik bandın hemen üstünde monomorfik bir bant deseni göze çarpmaktadır. Aynı primer kombinasyonunun İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların F_1'deki sonuçları Şekil 4.37'de verilmiştir. Aynı banda ebeveynler ile F_1'de baktığımız zaman hemen üstündeki monomorfik bantla bir bütün olarak saptanmış ve monomorfik olarak görülmüştür.



St İ 12 F_1

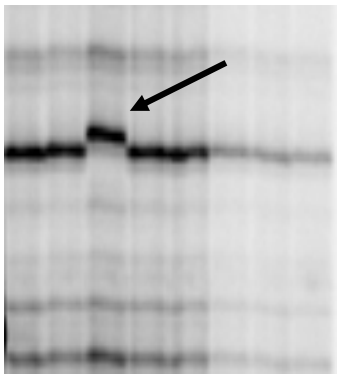
Şekil 4.37. E34 M71 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları (1. bant).



St 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 St

Şekil 4.38. E34 M71 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları (2. bant).

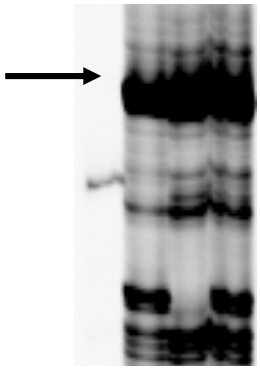
E34 M71 primer kombinasyonunun vermiş olduğu 2. polimorfik bandı incelemek amacıyla dayanıklı hatlarda yapılan AFLP analizleri sonucu Şekil 4.38'de verilmiştir. Yaklaşık 300 bp standart DNA büyüklüğünde saptanan polimorfik banda hatlarda baktığımız zaman; 12, 18 ve 26 numaralı hatların incelenen polimorfik banda sahip oldukları görülmektedir. Diğer dayanıklı hatlarda elde edilen bantlar polimorfik bandın çok az altında bulunmaktadır.



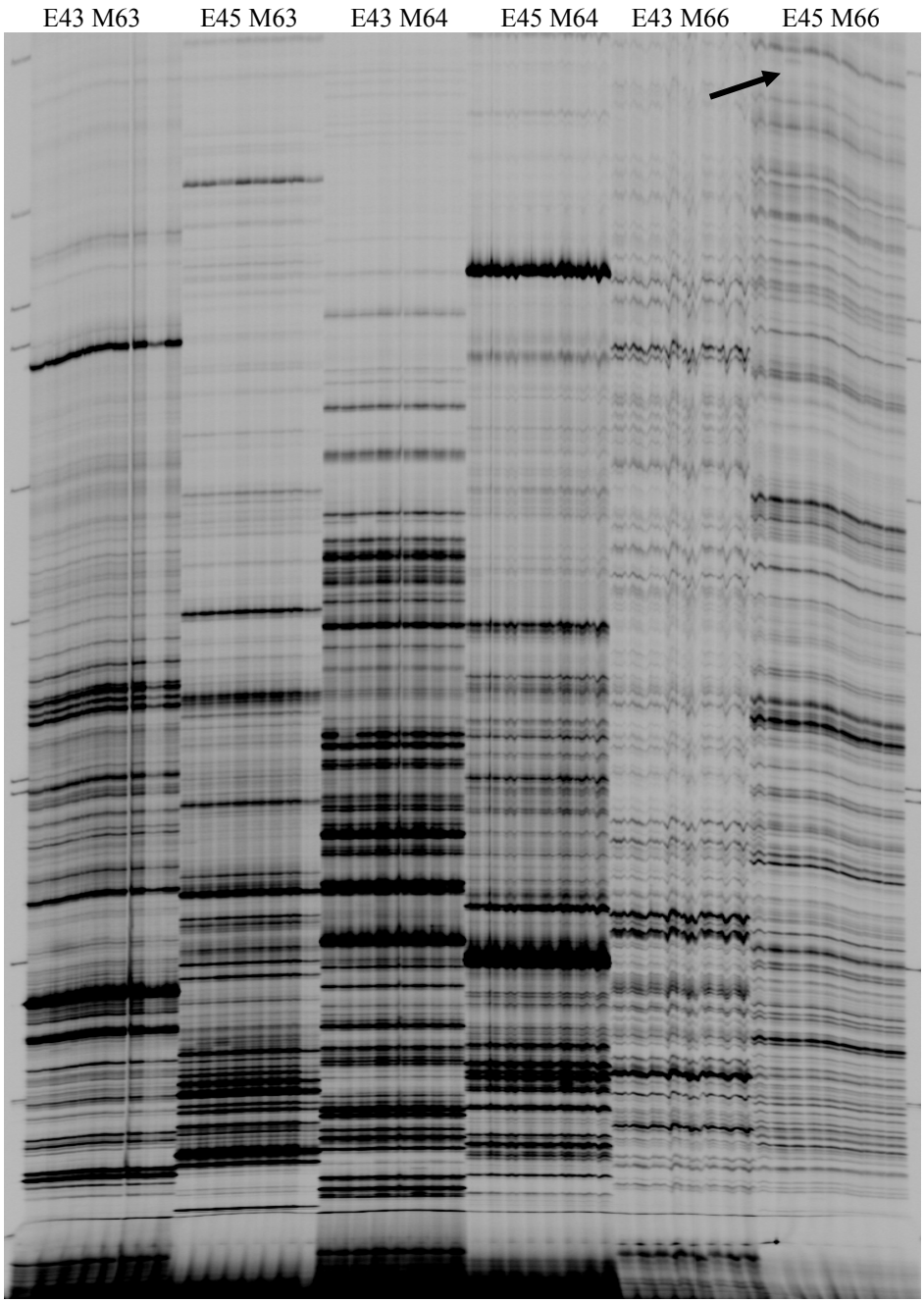
Şekil 4.39. E34 M71 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları (2. bant).

Şekil 4.39'da E34 M71 primer kombinasyonunun 300 bp standart DNA yakınlarında vermiş olduğu polimorfik bant DNA ve DNA bulklarında görülmektedir. Şekil 4.39 incelendiğinde; 3. örnek dışındaki tüm DNA veya DNA bulklarında bandın aynı büyüklükte olduğu, ancak 3. örnekte söz konusu bandın biraz daha büyük olduğu görülmektedir. Bunun nedeninin yüklemeden kaynaklanacağı düşünülmemektedir çünkü gözlenen diğer bantlar aynı hizada dolayısıyla aynı büyüklükte saptanmıştır.

Şekil 4.40'da İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların F_1'inde E34 M71 primerinin vermiş olduğu 2. polimorfik bant incelenmiş ve elde edilen sonuçlar gösterilmiştir. Araştırılan polimorfik bant ebeveynler ile F_1'de daha belirgin elde edilmiş ve 12 No'lu hat ile melezde bant kalınlığı daha geniş ve bant biraz daha yukarda belirlenmiştir. Aynı polimorfik bant hatlarda incelendiğinde benzer bant deseni görülmektedir (Şekil 4.38).

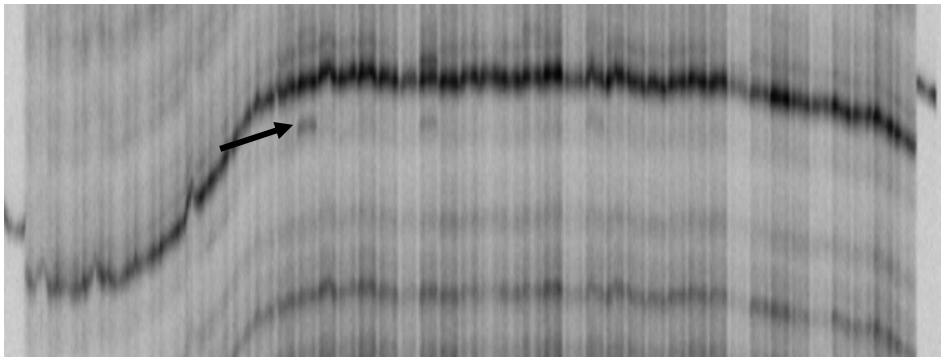


Şekil 4.40. E34 M71 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları (2. bant).



Şekil 4.41. E43-E45 primerlerinin M63-M64-M66 ile kombinasyonu.

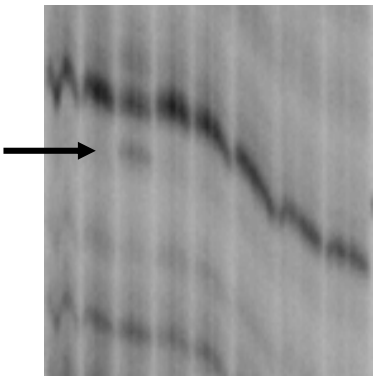
Şekil 4.41'de sırasıyla E43 M63, E45 M63, E43 M64, E45 M64, E43 M66 ve E45 M66 primer kombinasyonlarının oluşturulan DNA ve DNA bulklarında vermiş oldukları bant desenleri görülmektedir. İncelenen bu kombinasyonlardan E45 M66 primer kombinasyonu 460 bp standardının hemen altında polimorfik bir bant sergilemiştir. 12 No'lu hatta gözlenen bant diğer DNA veya DNA bulklarında görülmemiştir.



St 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 1516 1718 19 20 2122 23 24 25 26 2728 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41St

Şekil 4.42. E45 M66 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları.

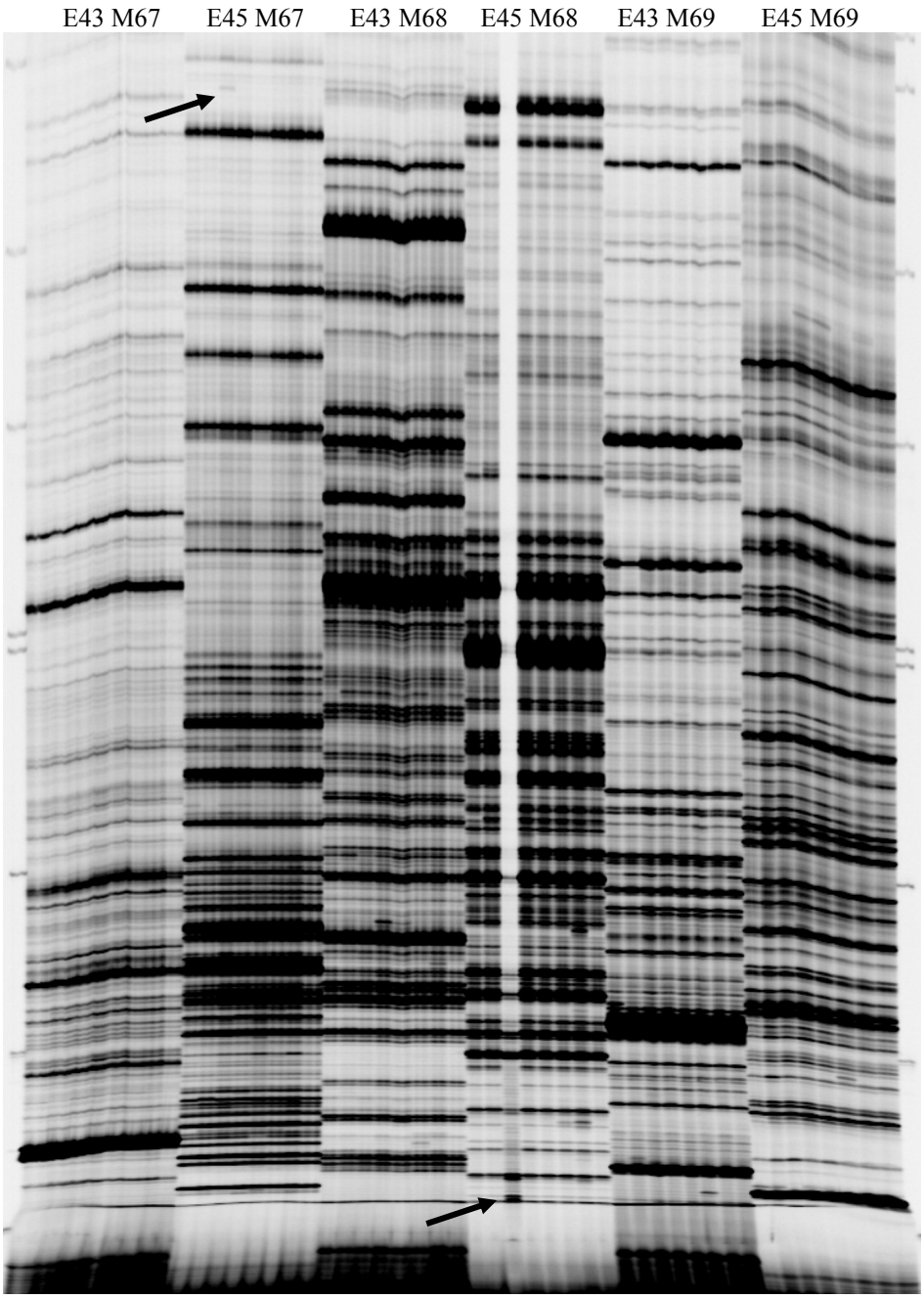
E45 M66 primer kombinasyonunun bulklarda saptanan polimorfik bandı dayanıklı hatlarda incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.42'de verilmiştir. Şekil 4.42 incelendiğinde araştırılan polimorfik bant 12, 18 ve 26 No'lu hatlarda belirlenmiştir. Polimorfik bant 12 No'lu hatta biraz daha belirgin, 18 ve 26 numaralı hatlarda silik elde edilmiştir.



Şekil 4.43. E45 M66 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.

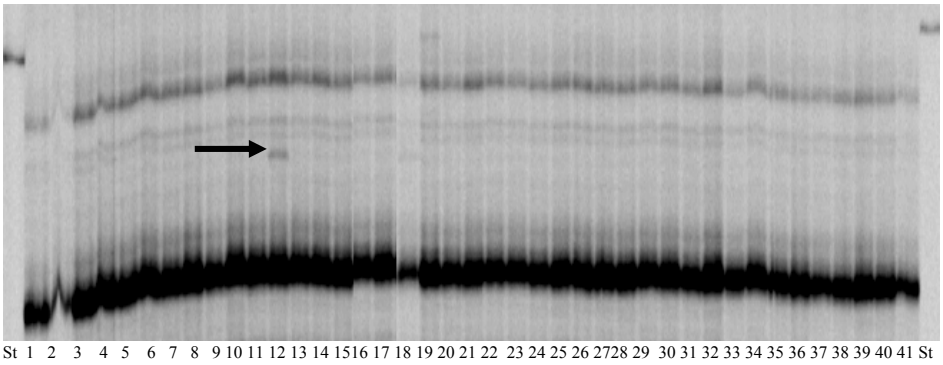
E45 M66 primer kombinasyonunun 460 bp standart DNA yakınlarında bulklarda vermiş olduğu polimorfik bant Şekil 4.43'de daha yakından görülmektedir. Şekil 4.43'den de anlaşıldığı gibi 3. örnekte diğer DNA veya bulklarda olmayan bir bant gözlenmektedir. Söz konusu polimorfik bant İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların melezinde birlikte tekrar incelenmek istenmiş ancak bant gözlenememiştir.

Daha öncede belirtildiği gibi tüm AFLP primer kombinasyonlarında EcoRI primerleri floresan olarak işaretlenmiş primerlerdir. Yürütme işleminin yapıldığı LI-COR cihazı bu floresan işaretlemeyi tanır ve bantları bu sayede görebiliriz. Ancak yürüme ilerledikçe cihazın floresan işaretlemeye duyarlılığı azalmaktadır ve bu nedenle de büyük moleküler ağırlıktaki bantlar çok belirgin elde edilememektedir ve kimi zaman da görülememektedir.



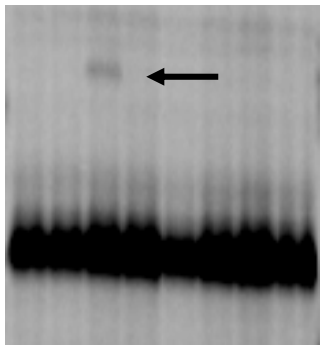
Şekil 4.44. E43-E45 primerlerinin M67-M68-M69 ile kombinasyonu.

Şekil 4.44'de DNA ve DNA bulklarında E43-E45 primerlerinin M67-M68-M69 ile kombinasyonunun vermiş olduğu sonuçlar görülmektedir. İncelenen primer kombinasyonlarından E45 M67 ile E45 M68 kombinasyonları sırasıyla 350 bp ve 50-100 bp standart DNA değerleri arasında polimorfik bantlar vermişlerdir. Sadece 3. örnekte görülen bantlar diğer hat veya bulklarda ya çok ince bantlar halinde ya da hiç görülememiştir. Bu nedenle bu primer kombinasyonları dayanıklı hatlarda ve ebeveynler ile F_1'de tekrar incelenmiştir.



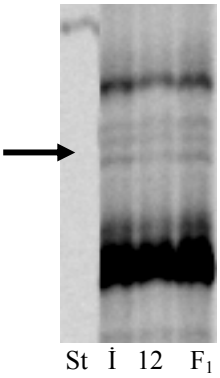
Şekil 4.45. E45 M67 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları.

E45 M67 primer kombinasyonunun bulklarda vermiş olduğu polimorfik bant DNA ve DNA bulklarının oluşturulduğu dayanıklı hatlarda incelenmek istenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.45'de gösterilmiştir. Araştırılan polimorfik bant sadece 12 No'lu hatta saptanmış diğer hatlarda bant belirlenmemiştir.

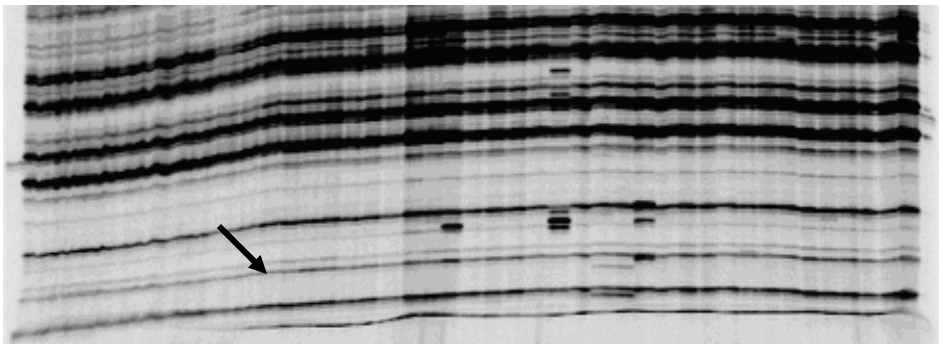


Şekil 4.46. E45 M67 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.

Şekil 4.46'da E45 M67 primer kombinasyonunun 350 bp standardı yakınlarında DNA ve DNA bulklarında vermiş olduğu polimorfik bant daha yakından gösterilmiştir. Şekil 4.47'de ise aynı primer kombinasyonunun İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların F_1'inde göstermiş olduğu bant şablonu görülmektedir. Araştırılan polimorfik bant İzmir 85, 12 No'lu hat ve F_1'de gözlenmiş ve bunlar arasında monomorfik olarak belirlenmiştir.

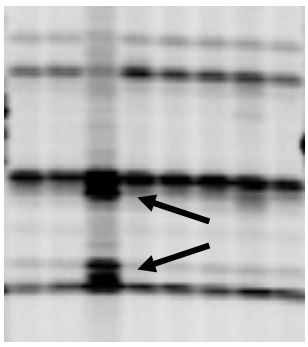


Şekil 4.47. E45 M67 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.



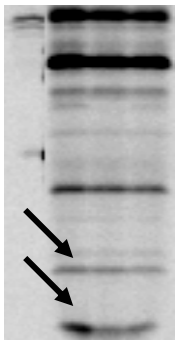
Şekil 4.48. E45 M68 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları.

E45 M68 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında vermiş olduğu 50-100 bp standart DNA büyüklüğündeki polimorfik bant dayanıklı hatlarda incelenmiştir. Şekil 4.48'de E45 M68 kombinasyonunun hatlarda vermiş olduğu sonuçlar gösterilmiştir. Şekil 4.48 incelendiğinde; araştırılan polimorfik bant bakımından hatlar arasında bir farklılık görülmemektedir. Dikkati çeken başka polimorfik bantlar elde edilmiştir ancak bunların *Lr13*'ü taşıyan 12 No'lu hatta bulunmadığı görülmektedir.

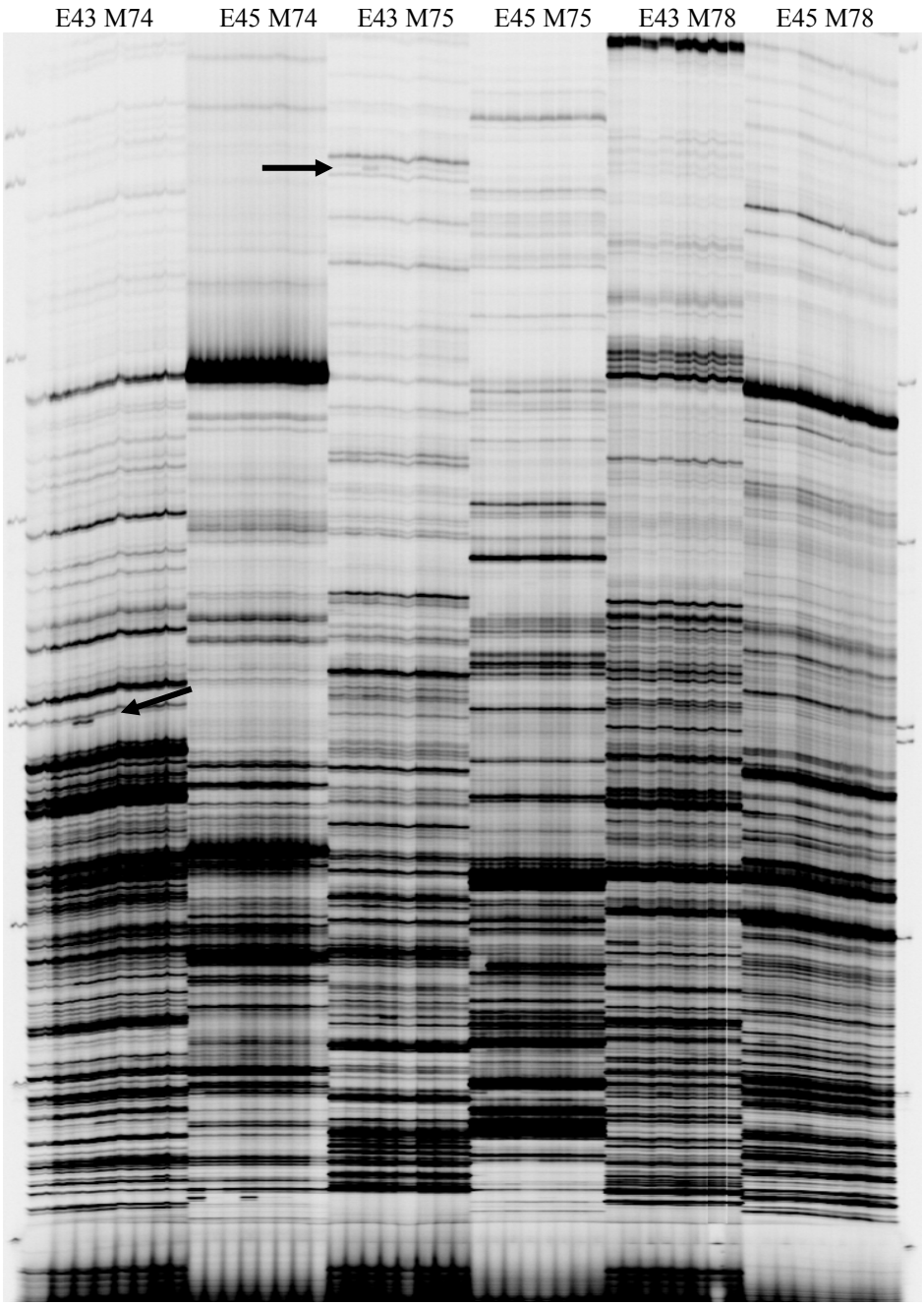


Şekil 4.49. E45 M68 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.

Şekil 4.49'da E45 M68 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında vermiş olduğu polimorfik bant daha yakından görülmektedir. Aynı primer kombinasyonu İzmir 85, 12 No'lu hat ve F_1'de incelemeye alınmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.50'de verilmiştir. Şekil 4.49'da elde edilen polimorfik banda Şekil 4.50'de rastlanmamıştır. Şekil 4.49'da da görüldüğü gibi polimorfik bantlar (2 adet) E45 M68 kombinasyonunun vermiş olduğu ilk bandın hemen üstündedir. Ancak ebeveynler ile F_1'de bu bantlar hiç görülmemektedir. Şekil 4.49'a tekrar bakıldığında; polimorfik bantların elde edildiği 3. örnekte bir yükleme hatası veya jelin yapısından kaynaklanan bir hata olduğu görülmektedir. Dolayısıyla polimorfik olarak kabul edilen bantlar aslında belirtilen hatalardan oluşan bant kaymaları ya da yığınları olarak düşünülmüştür.

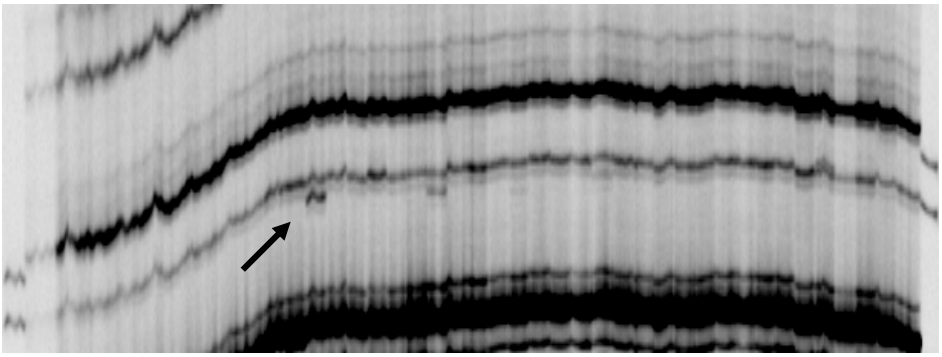


Şekil 4.50. E45 M68 primer kombinasyonunun ebeveynlerde ve F_1'deki sonuçları.



Şekil 4.51. E43-E45 primerlerinin M74-M75-M78 ile kombinasyonu.

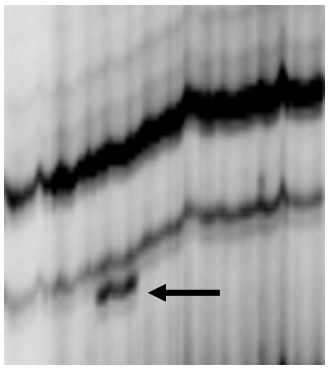
Sırasıyla E43 M74, E45 M74, E43 M75, E45 M75, E43 M78 ve E45 M78 primer kombinasyonlarının DNA ve DNA bulklarında vermiş oldukları bant desenleri Şekil 4.51'de görülmektedir. Bu primer kombinasyonlarından E43 M74 kombinasyonu 200 bp, E43 M75 kombinasyonu ise 350 bp standardı yakınlarında polimorfik birer bant vermişlerdir. Şekil 4.51 incelendiğinde polimorfik bantların 3. örnekte (12 No'lu hat) bulundukları ve diğer hat ve bulklarda bulunmadıkları açık bir şekilde görülmektedir.



St 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 St

Şekil 4.52. E43 M74 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları.

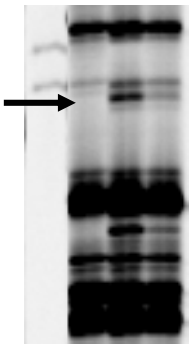
E43 M74 primer kombinasyonun 200 bp yakınlarında göstermiş olduğu polimorfik bant dayanıklı hatlarda incelenmiş ve Şekil 4.52'de verilmiştir. Şekil 4.52'den de görüldüğü gibi polimorfik bant 12 No'lu hatla birlikte 18 No'lu hatta da saptanmıştır. Ancak 12 No'lu hatta bant daha net bir şekilde görülmektedir.



1 2 3 4 5 6 7 8

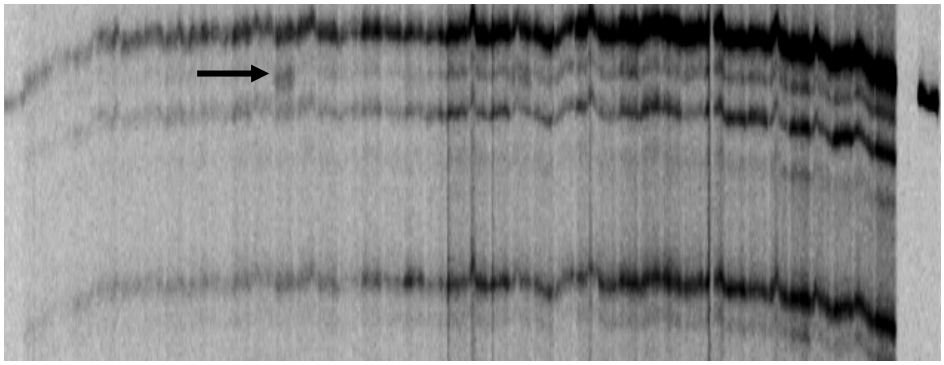
Şekil 4.53. E43 M74 primer kombinasyonunun bulklarda sonuçları.

E43 M74 AFLP primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında göstermiş olduğu polimorfik bant daha yakından Şekil 4.53'de verilmiştir. Aynı primer kombinasyonunun İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların F_1'inde vermiş olduğu sonuçlar Şekil 4.54'de görülmektedir. Şekil 4.54 incelendiğinde; söz konusu polimorfik banda 12 No'lu hat ve F_1'in sahip olduğu, İzmir 85 çeşidinde bandın olmadığı görülmektedir. Diğer bir ifade ile polimorfik bant dayanıklı ebeveyn ile F_1'de saptanmıştır.



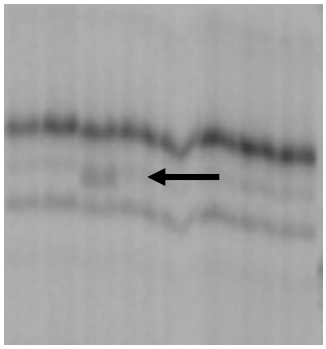
St İ 12 F_1

Şekil 4.54. E43 M74 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.



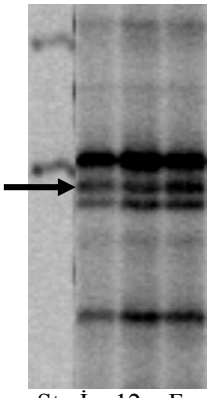
Şekil 4.55. E43 M75 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları.

Şekil 4.55'de E43 M75 primer kombinasyonunun hatlarda yapılmış analiz sonuçları verilmiştir. 350 bp standart DNA yakınlarında görülen polimorfik bant sadece 12 No'lu hatta saptanmıştır. Diğer hatlarda bu bant gözlenmemiştir.

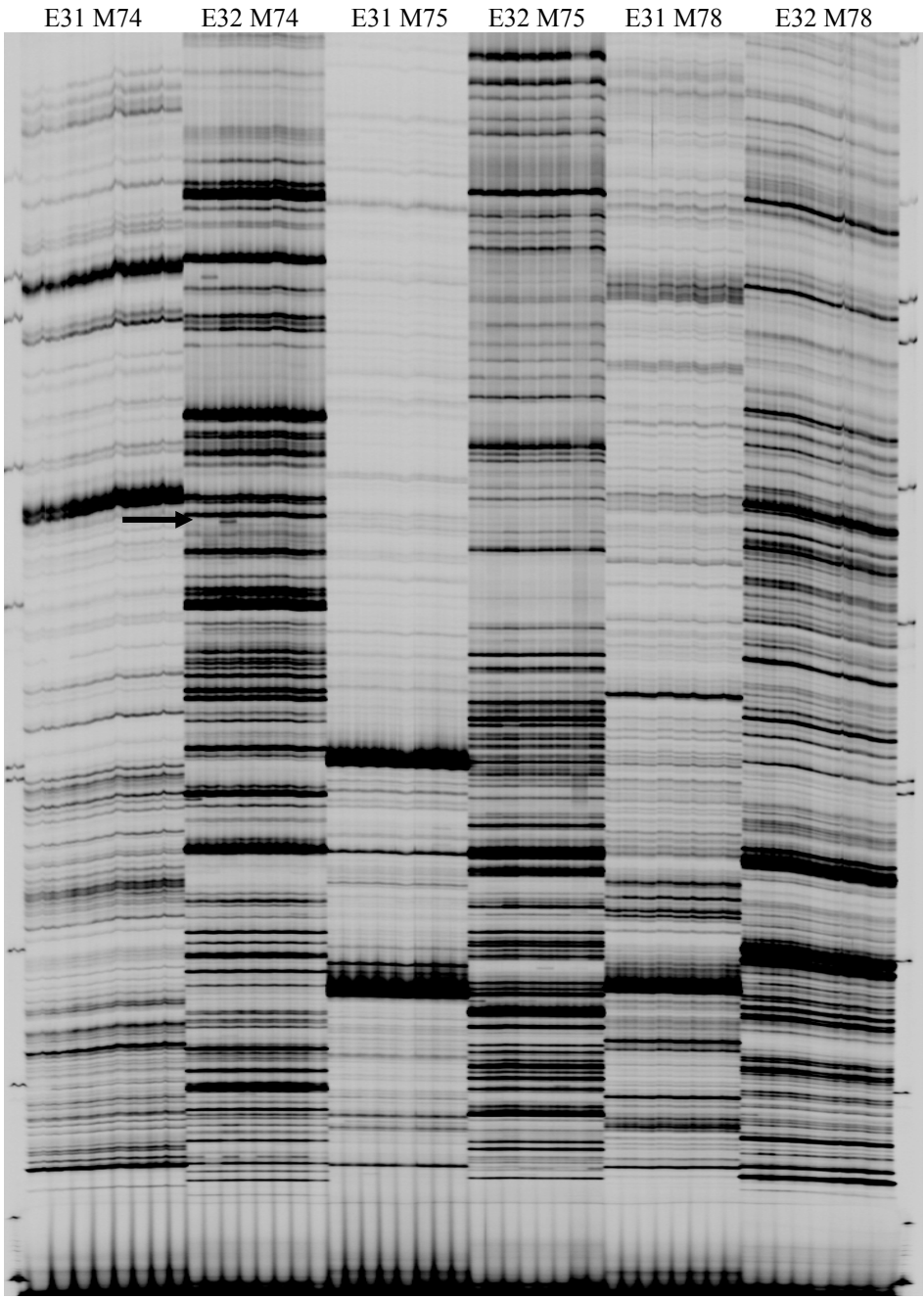


Şekil 4.56. E43 M75 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.

E43 M75 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında vermiş olduğu polimorfik bant Şekil 4.56'da gösterilmiştir. Tüm DNA ve DNA bulklarında monomorfik bir bandın hemen altında saptanan polimorfik bant 3. örnekte görülmektedir. Aynı primer kombinasyonunun İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların F_1'inde vermiş olduğu bant şablonu Şekil 4.57'de gösterilmiştir. Şekil 4.56'da açık bir şekilde görülen polimorfik bant ebeveynler ile F_1'in incelendiği Şekil 4.57'de monomorfik olarak saptanmıştır. Ayrıca ebeveynler ile F_1'de elde edilen bantlar daha net ve birbirine daha yakın görülmektedir. Ancak kullanılan standart DNA yardımıyla aranan ya da istenen bantlar belirlenebilir. Tamamen jelin yapısından ve hazırlanışından kaynaklanan bu tür farklılıklar özellikle akrilamid jelde görülebilmektedir.

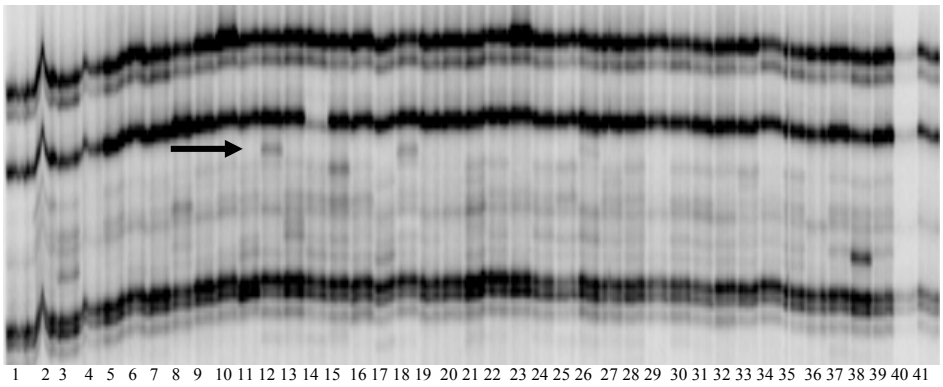


Şekil 4.57. E43 M75 primer kombinasyonunun ebeveynlerde ve F_1'de sonuçları.



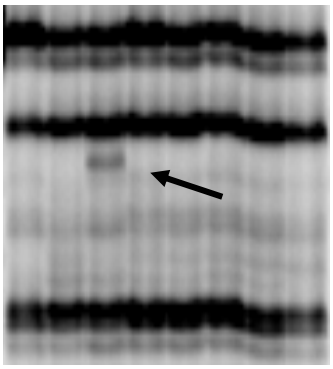
Şekil 4.58. E31-E32 primerlerinin M74-M75-M78 ile kombinasyonu.

E31 M74, E32 M74, E31 M75, E32 M75, E31 M78 ve E32 M78 AFLP primer kombinasyonları DNA ve DNA bulklarında incelenmiş ve elde edilen sonuçlar sırasıyla Şekil 4.58'de gösterilmiştir. Bu kombinasyonlardan E32 M74 primer kombinasyonu 255 ile 300 bp standart DNA arasında polimorfik bir bant sergilemiştir.



Şekil 4.59. E32 M74 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları.

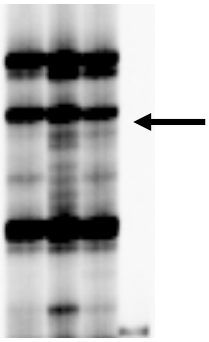
E32 M74 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında vermiş olduğu polimorfik bant dayanıklı hatlarda incelenmiştir. E32 M74 kombinasyonun hatlarda yapılan analiz sonuçları Şekil 4.59'da gösterilmiştir. Şekil 4.59 incelendiğinde; araştırılan polimorfik bant 12 ve 18 No'lu hatlarda net bir şekilde, 26 No'lu hatta ise silik olarak saptanmıştır.



1 2 3 4 5 6 7 8

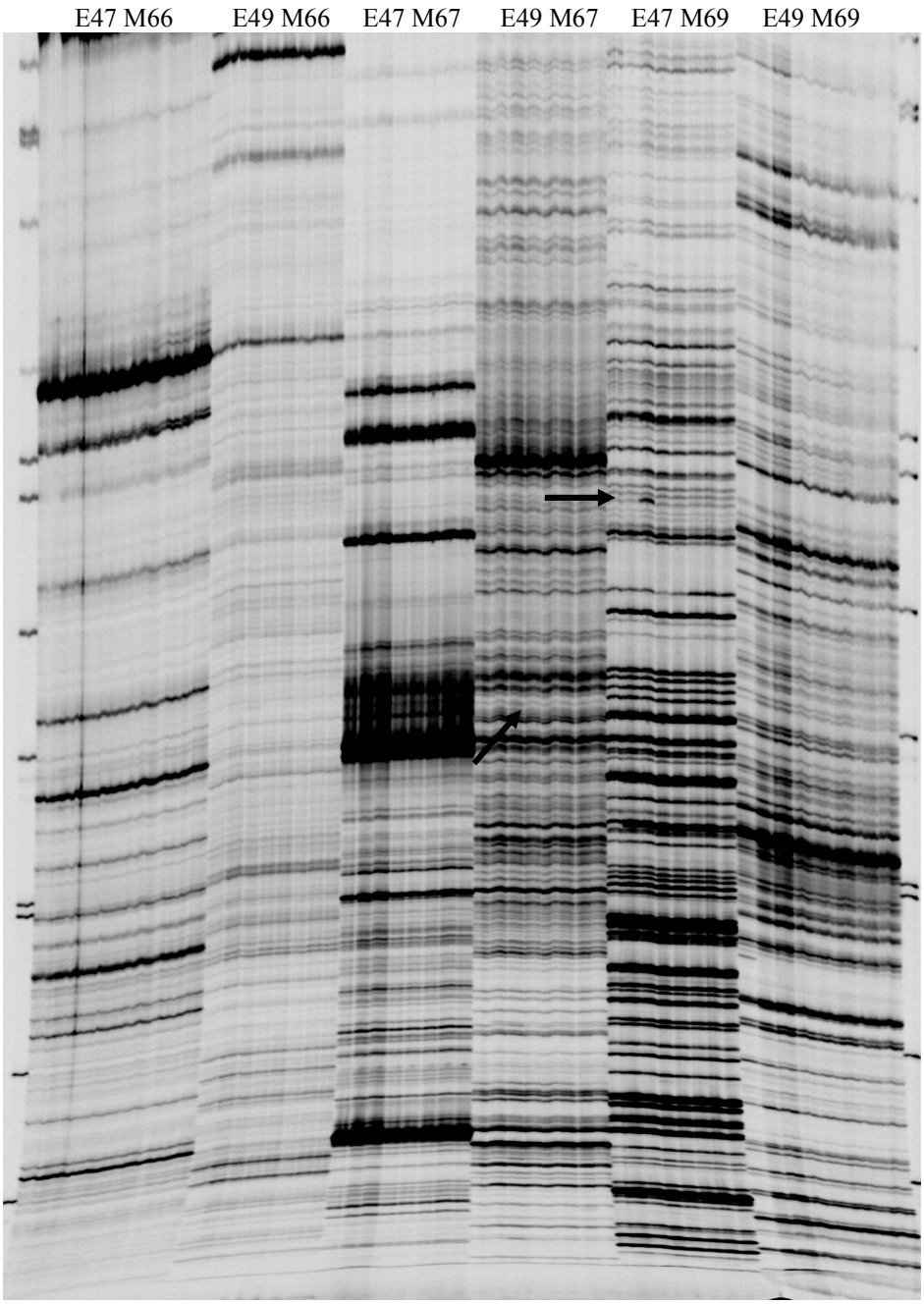
Şekil 4.60. E32 M74 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.

Şekil 4.60'da E32 M74 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında vermiş olduğu polimorfik bant daha yakından görülmektedir. Şekil 4.61'de aynı primer kombinasyonunun İzmir 85, 12 No'lu hat ve F_1'de göstermiş olduğu polimorfik bant görülmektedir. Şekil 4.61'e bakıldığında; polimorfik bandın 12 No'lu hatta daha belirgin olduğu, melezde biraz silik bulunduğu ve İzmir 85 duyarlı çeşidinde ise bandın hiç görülmediği anlaşılmaktadır.



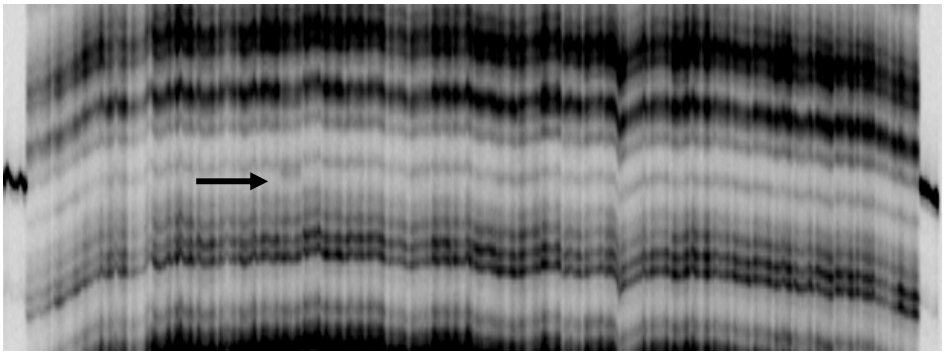
İ 12 F_1 St

Şekil 4.61. E32 M74 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.



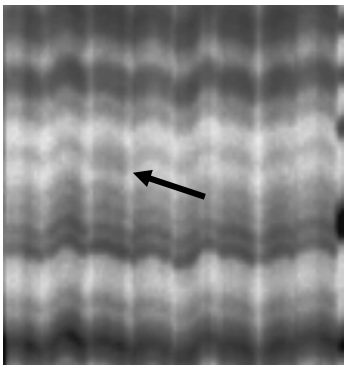
Şekil 4.62. E47-E49 primerlerinin M66-M67-M69 ile kombinasyonu.

Şekil 4.62'de DNA ve DNA bulklarında E47-E49 primerlerinin M66-M67-M69 ile kombinasyonu sonuçları verilmiştir. İncelenen primer kombinasyonlarından E49 M67 ve E47 M69 kombinasyonları 3. örnekte polimorfik bantlar vermişlerdir. E49 M67 kombinasyonundan elde edilen bant 255 bp standart DNA'nın hemen altında, E47 M69 kombinasyonundan elde edilen bant 350 bp standardının yakınlarında yer almıştır.



Şekil 4.63. E49 M67 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları.

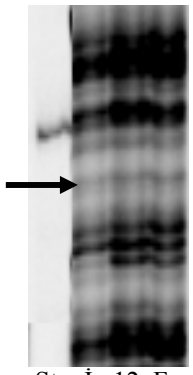
Şekil 4.63'de polimorfik bir bant elde edilen E49 M67 primer kombinasyonunun Thatcher yakın izogenik hatlarda vermiş olduğu bant deseni görülmektedir. Şekil incelendiğinde polimorfik bandın biraz silik olması ile birlikte sadece 12 No'lu hatta bulunduğu, diğer dayanıklı hatlarda olmadığı görülmektedir.



1 2 3 4 5 6 7 8

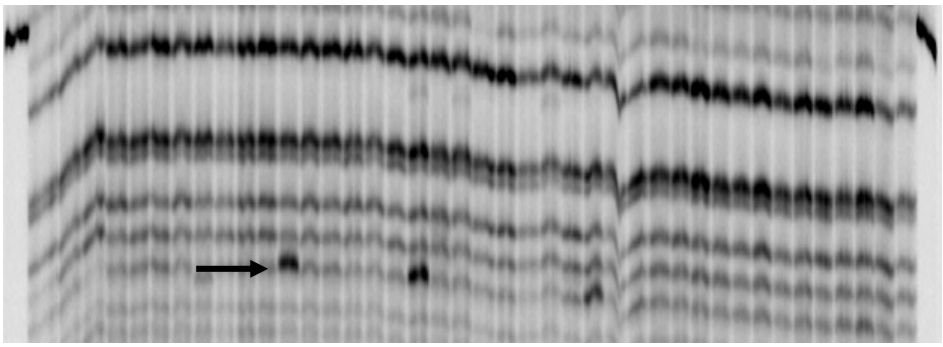
Şekil 4.64. E49 M67 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.

DNA ve DNA bulklarında E49 M67 primer kombinasyonunun göstermiş olduğu polimorfik bant Şekil 4.64'de görülmektedir. Aynı primer kombinasyonunun İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların F_1'inde vermiş olduğu bant şablonu Şekil 4.65'de gösterilmiştir. Şekil 4.65'de söz konusu bant monomorfik olarak gözlenmiştir.



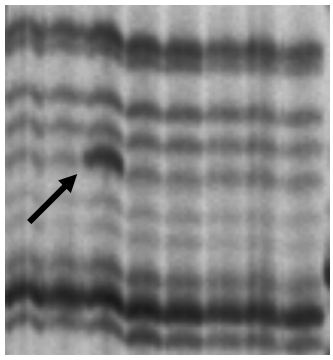
St İ 12 F_1

Şekil 4.65. E49 M67 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.



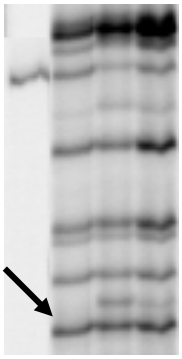
Şekil 4.66. E47 M69 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları.

Şekil 4.66'da E47 M69 primer kombinasyonunun 300-350 bp standartları arasında dayanıklı hatlarda göstermiş olduğu polimorfik bant görülmektedir. Şekil incelendiğinde; 12, 18 ve 26 numaralı hatların diğer hatlarda bulunan bantlardan daha kalın bir banda sahip oldukları görülmektedir. Söz konusu bu kalınlık aynı noktada iki bandın olmasından kaynaklanabilir.



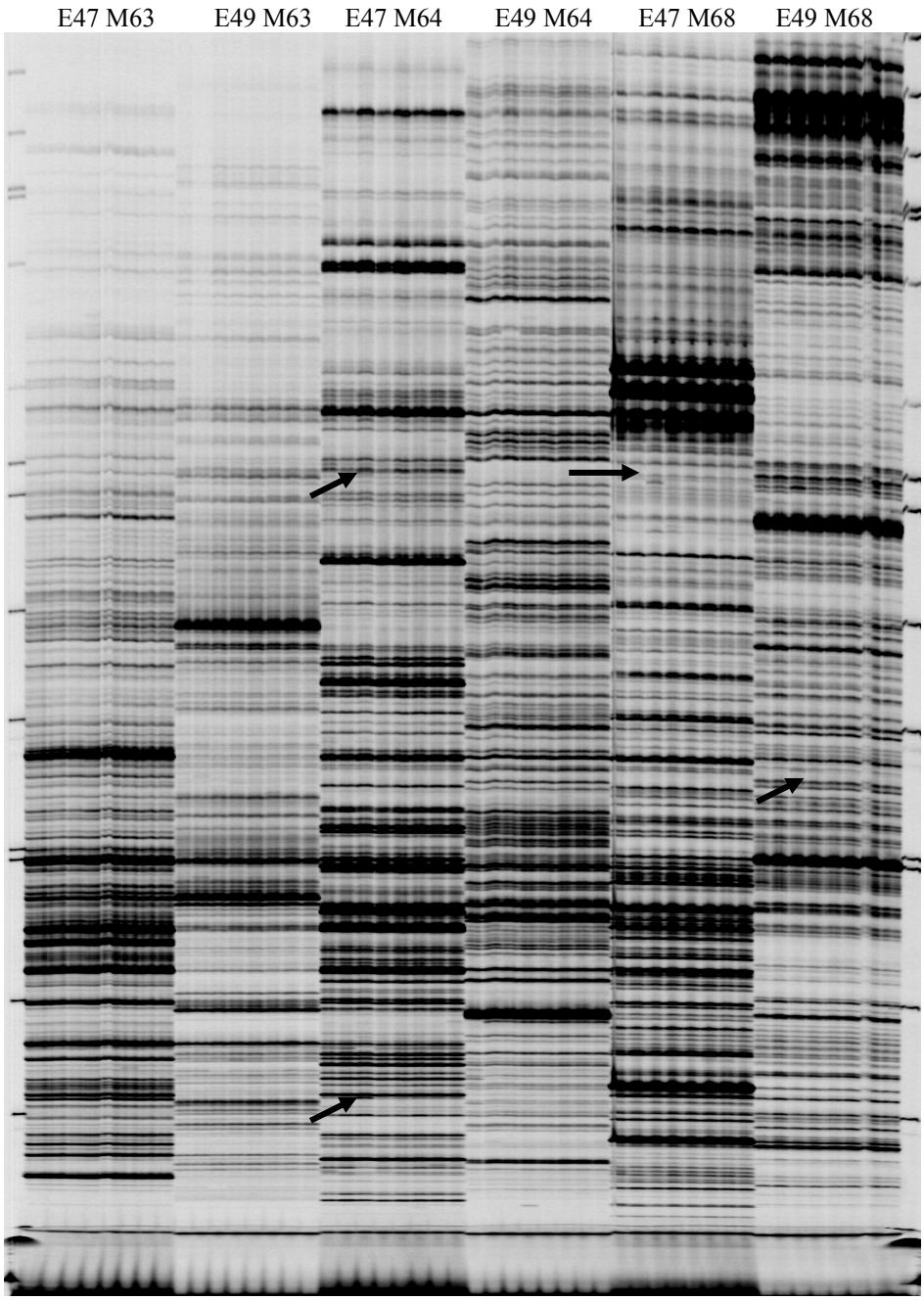
Şekil 4.67. E47 M69 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.

Şekil 4.67'de E47 M69 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında vermiş olduğu polimorfik bant deseni görülmektedir. Polimorfik bant hemen üstünde bulunan monomorfik bir bantla bir bütün olarak görülmektedir. Aynı primer kombinasyonunun İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların F_1'inde vermiş olduğu sonuçlar ise Şekil 4.68'de gösterilmiştir. Ancak Şekil 4.68'e bakıldığında; araştırılan polimorfik bandın ebeveynler ile F_1'de monomorfik olarak ortaya çıktığı saptanmıştır. Bu bandın hemen üstünde bulunan, DNA ve DNA bulklarında ve ayrıca dayanıklı hatlarda monomorfik olan başka bir bant 12 No'lu hat ve F_1'de saptanmış İzmir 85'de saptanmamıştır. Ancak bu bandın *Lr13* geni ile ilgisi olmadığı düşünülmektedir.



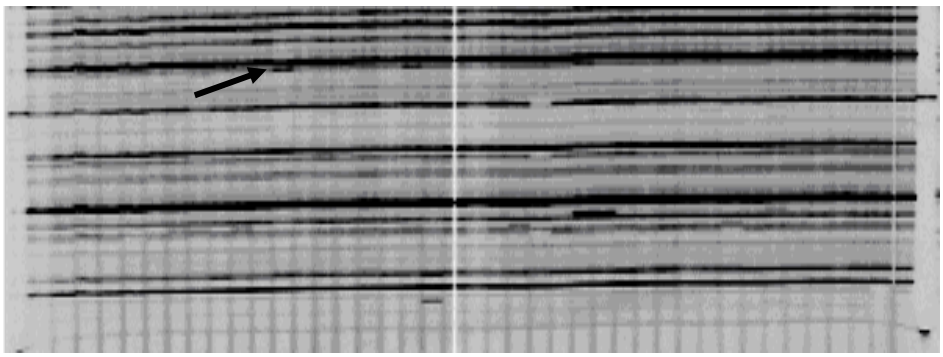
St İ 12 F_1

Şekil 4.68. E47 M69 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.



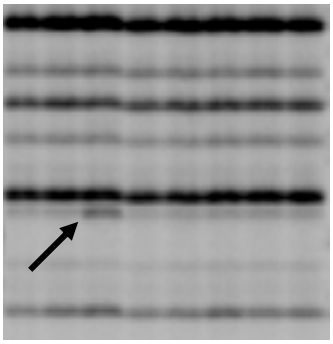
Şekil 4.69. E47-E49 primerlerinin M63-M64-M68 ile kombinasyonu.

Şekil 4.69'da E47 M63, E49 M63, E47 M64, E49 M64, E47 M68 ve E49 M68 primer kombinasyonların DNA ve DNA bulklarında vermiş olduğu sonuçlar görülmektedir. İncelenen bu primer kombinasyonlarından E47 M64, E47 M68 ve E49 M68 kombinasyonları 3. örnekte polimorfik bantlar vermişlerdir. Standart DNA baz alındığında E47 M64 primer kombinasyonu 100 bp ile 364 bp yakınlarında 2 farklı polimorfik bant vermiştir. E47 M68 kombinasyonu 350-364 bp değerleri arasında, E49 M68 primer kombinasyonu ise 255 bp'in altında birer polimorfik bant vermiştir. Bu bantlar hatlarda ve ebeveynler ile F_1'de tekrar incelenmiştir.



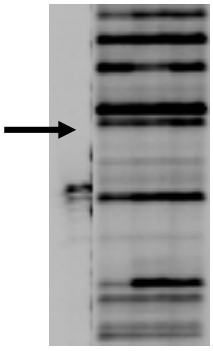
Şekil 4.70. E47 M64 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları (1. bant).

E47 M64 primer kombinasyonunun bulklarda vermiş olduğu ve 100 bp'in üstünde bulunan polimorfik bandı incelemek amacıyla hatlarda yapılmış analiz sonucu Şekil 4.70'de verilmiştir. Şekil 4.70 incelendiğinde; polimorfik banda 12, 18 ve 26 No'lu hatların sahip olduğu ve bu bantlarında hemen üstünde bulunan monomorfik bantla çok yakın oldukları görülmektedir.

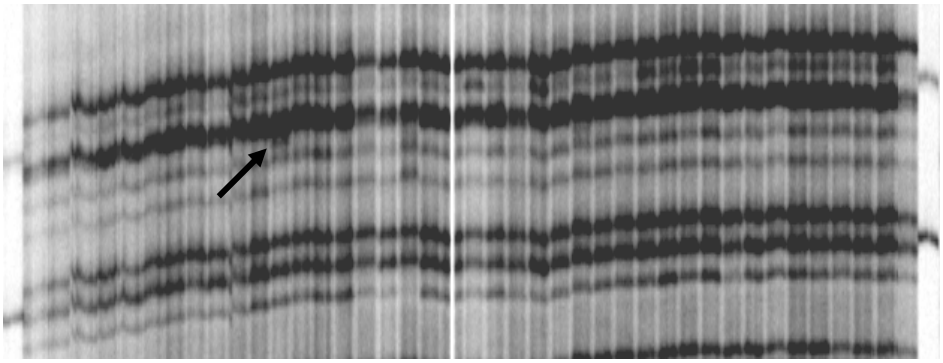


Şekil 4.71. E47 M64 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları (1. bant).

E47 M64 kombinasyonunun 100 bp yakınlarında 3. örnekte vermiş olduğu polimorfik bant Şekil 4.71'de daha yakından görülmektedir. Aynı primer kombinasyonunun İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların F_1'de göstermiş olduğu sonuç Şekil 4.72'de verilmiştir. Araştırılan bandın ebeveynler ile birlikte F_1'de de bulunduğu ve monomorfik olduğu saptanmıştır.

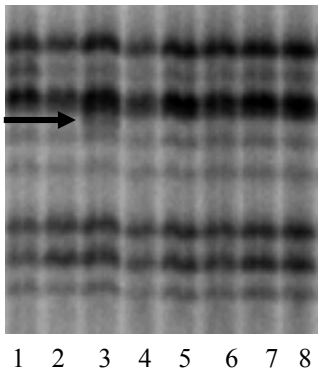


Şekil 4.72. E47 M64 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları (1. bant).



Şekil 4.73. E47 M64 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları (2. bant).

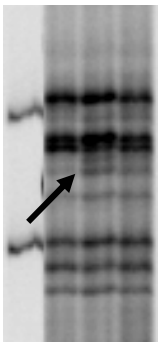
E47 M64 primer kombinasyonundan elde edilen polimorfik bant dayanıklı hatlarda araştırılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.73'de verilmiştir. İncelenen bant 364 bp standardının hemen altında bulunan monomorfik bantla bir bütün olarak görülmektedir ve sadece 12 No'lu hatta belirlenmiştir.



Şekil 4.74. E47 M64 primer kombinasyonunun bulklarda sonuçları (2. bant).

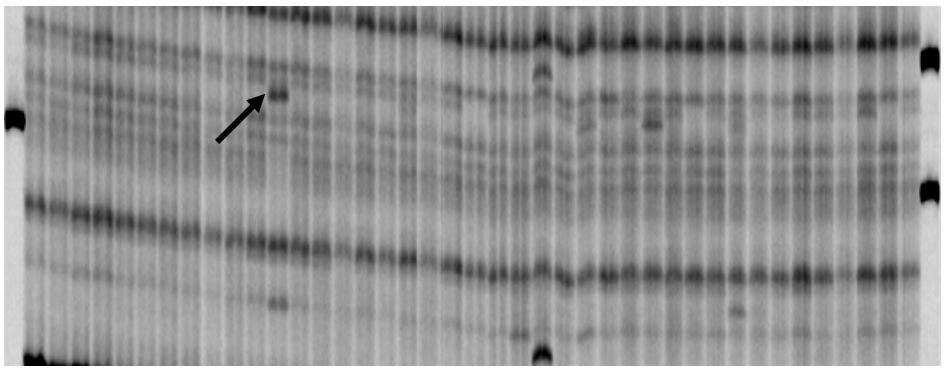
Şekil 4.74'de E47 M64 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında vermiş olduğu sonuçlar görülmektedir. Şekil incelendiğinde polimorfik bant üstteki monomorfik bandın hemen altındadır. Aynı

primer kombinasyonu İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların F_1'de incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.75'de verilmiştir. Şekil 4.75 incelendiğinde sadece 12 No'lu hatta saptanan bant şekilde çok net olarak görülmemektedir. Söz konusu bant polimorfik bir bant olmasına rağmen F_1'de saptanmamıştır.



St İ 12 F_1

Şekil 4.75. E47 M64 primer kombinasyonunun ebeveynlerde ve F_1'deki sonuçları (2. bant).

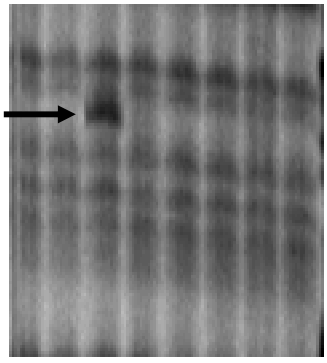


St 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 St

Şekil 4.76. E47 M68 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları.

Şekil 4.76'da E47 M68 primer kombinasyonunun 350-364 bp standartları arasında vermiş olduğu polimorfik bant hatlarda incelenmiştir. Şekle bakıldığında; polimorfik bant 12 No'lu hatta net bir

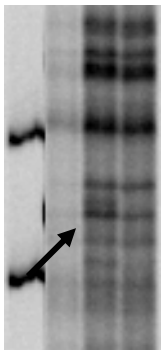
şekilde bulunmakta ancak 26, 29 ve 33 numaralı hatlarda da aynı bant silik bir şekilde görülmektedir.



1 2 3 4 5 6 7 8

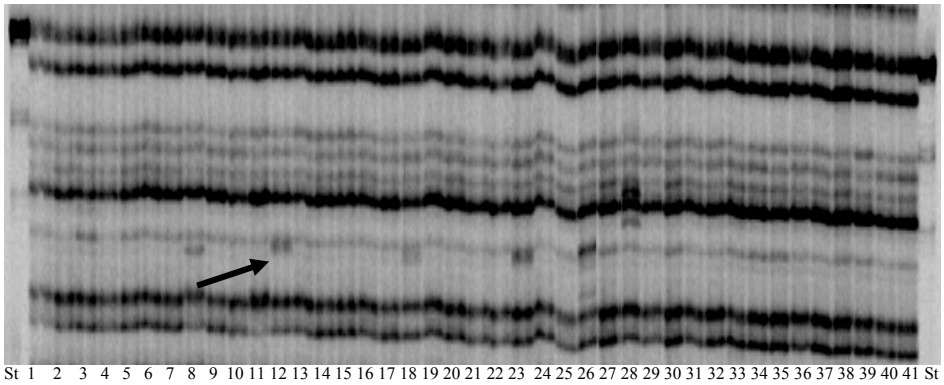
Şekil 4.77. E47 M68 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.

E47 M68 primer kombinasyonunun bulklarda vermiş olduğu polimorfik bant Şekil 4.77 daha yakından görülmektedir. Aynı primer kombinasyonun İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların F_1'inde göstermiş olduğu bant deseni de Şekil 4.78'de gösterilmiştir. İncelenen polimorfik bant ebeveynler ile F_1'de saptanmış ve monomorfik olarak belirlenmiştir.



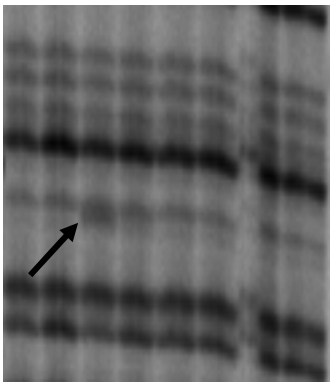
St İ 12 F_1

Şekil 4.78. E47 M68 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.



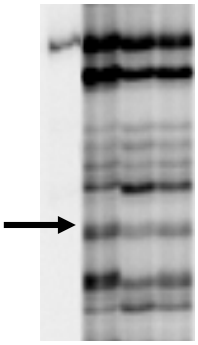
Şekil 4.79. E49 M68 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları.

Bulklarda polimorfik bant veren diğer bir primer kombinasyonu E49 M68'in dayanıklı hatlarda göstermiş olduğu bant şablonu Şekil 4.79'da verilmiştir. 255 bp standardının altında gözlenen polimorfik bant 8, 12, 18, 23 ve 26 No'lu hatlarda saptanmıştır.



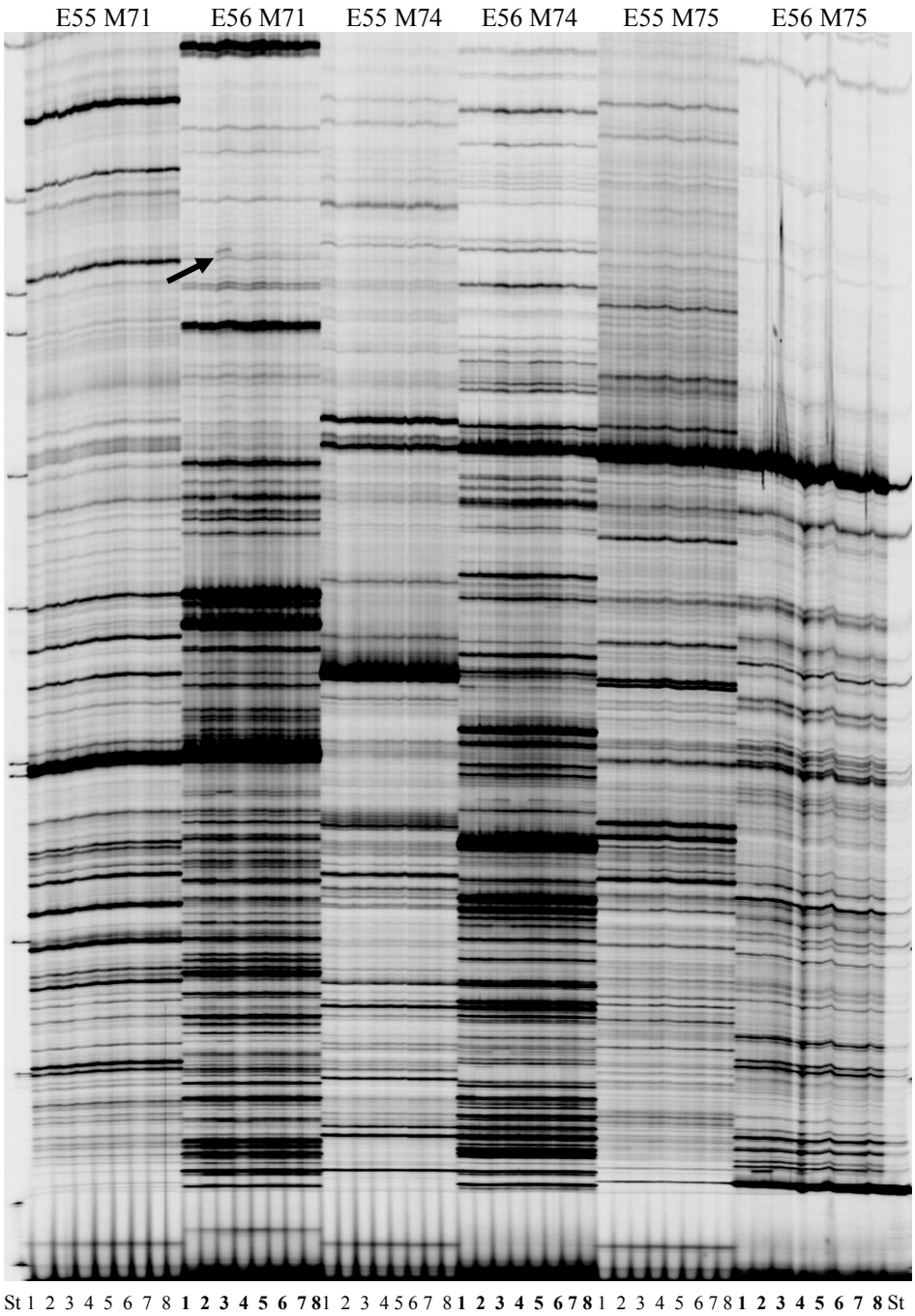
Şekil 4.80. E49 M68 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.

Şekil 4.80'de polimorfik bant veren E49 M68 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında vermiş olduğu bant şablonu görülmektedir. Şekil incelendiğinde; monomorfik bir bandın hemen altında polimorfik bir bant görülmekte ve bu bant sadece 3. örnekte bulunmaktadır. Söz konusu polimorfik bant İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların F_1'inde incelenmek istenmiş ve E49 M68 primer kombinasyonunun ebeveynler ile F_1'de göstermiş olduğu bant deseni Şekil 4.81'de verilmiştir. Şekil 4.81 incelendiğinde; İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların F_1'inde incelenen bandın bulunduğu ve dolayısıyla monomorfik bir bant olduğu saptanmıştır.



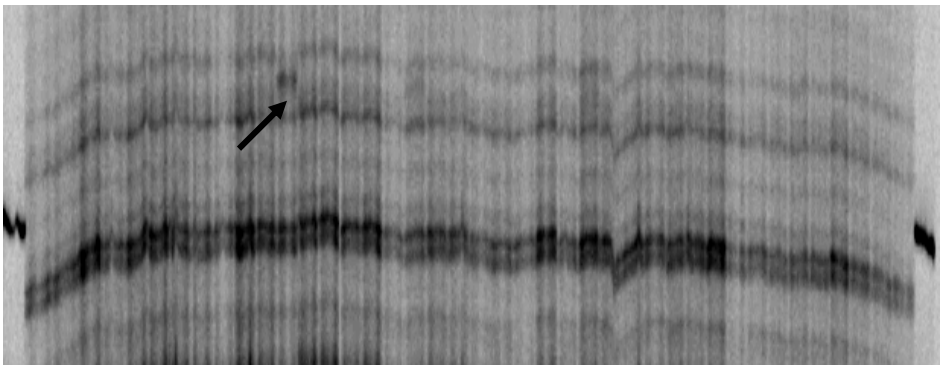
St İ 12 F_1

Şekil 4.81. E49 M68 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.



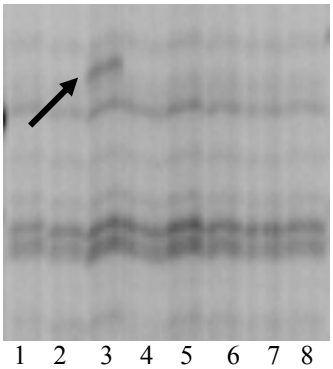
Şekil 4.82. E55-E56 primerlerinin M71-M74-M75 ile kombinasyonu.

DNA ve DNA bulklarında E55-E56 primerlerinin M71-M74-M75 primerleri ile kombinasyonu sonuçları Şekil 4.82'de gösterilmiştir. Bu kombinasyonlardan E56 M71 primer kombinasyonu 364 bp standart DNA segmentinin üstünde sadece 3. örnekte bir bant vermiştir. Diğer DNA ya da DNA bulklarında bu bant gözlenmemiştir.



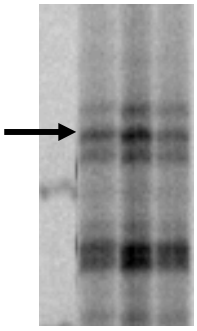
Şekil 4.83. E56 M71 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları.

E56 M71 primer kombinasyonu dayanıklı hatlarda incelenmiş ve elde edilen sonuçlar şekil 4.83'de verilmiştir. 12 No'lu hatta net bir şekilde belirlenen bant diğer hatlarda bu netlikte görülememektedir. Ancak 18 No'lu hatla birlikte 26 No'lu hatta da aynı bant çok silik bir şekilde de olsa saptanmıştır.

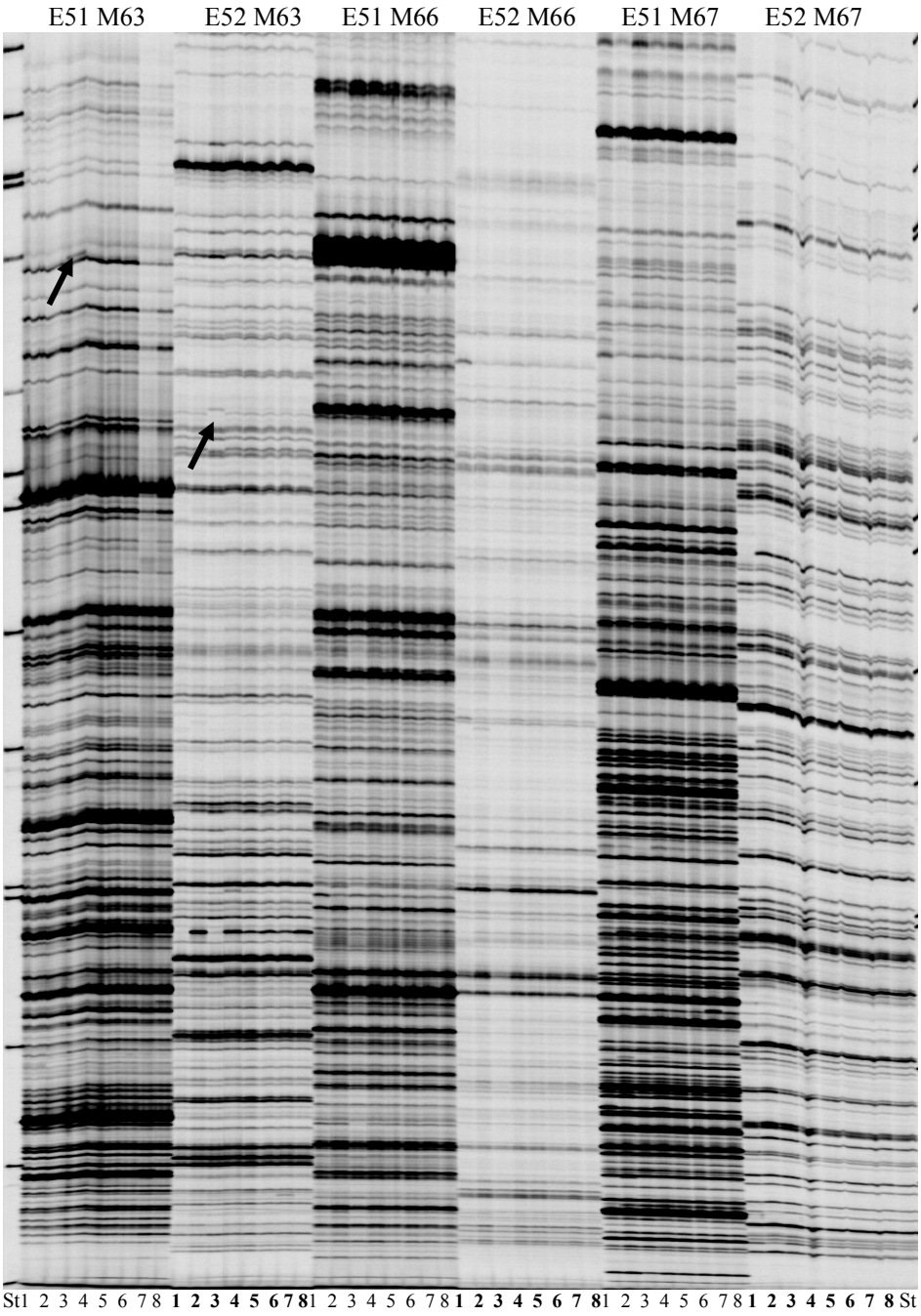


Şekil 4.84. E56 M71 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.

Şekil 4.84'de E56 M71 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında vermiş olduğu polimorfik bant deseni görülmektedir. Aynı primer kombinasyonu İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların F_1'inde incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.85'de verilmiştir. Şekil 4.85 incelendiğinde; araştırılan bant İzmir 85, 12 No'lu hat ve F_1'in hepsinde saptanmıştır. Dolayısıyla bu bant ebeveynler ile melez arasında monomorfik olarak belirlenmiştir.

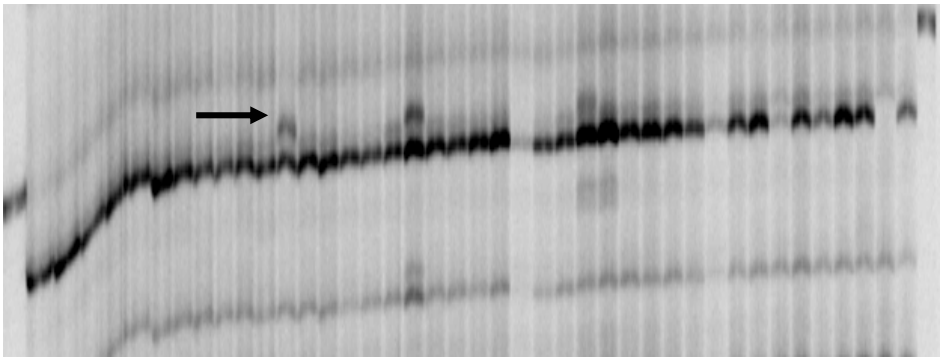


Şekil 4.85. E56 M71 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.



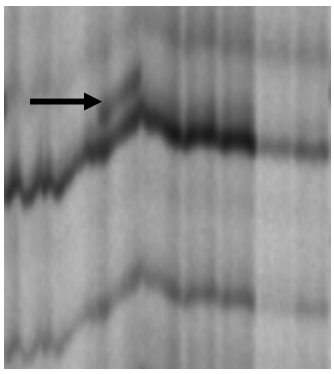
Şekil 4.86. E51-E52 primerlerinin M63-M66-M67 ile kombinasyonu.

Çalışmada incelenen AFLP primer kombinasyonlarından E51 M63, E52 M63, E51 M66, E52 M66, E51 M67 ve E52 M67'nin DNA ve DNA bulklarında vermiş olduğu sonuçlar Şekil 4.86'da görülmektedir. İncelenen bu kombinasyonlardan E51 M63 primer kombinasyonu 460 bp standardının altında, E52 M63 kombinasyonu ise 364-400 bp standartları arasında birer polimorfik bant vermişlerdir. Bu primer kombinasyonları dayanıklı hatlarla birlikte İzmir 85, 12 No'lu hat ile bunların F_1'inde tekrar incelenmiştir.



Şekil 4.87. E51 M63 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları.

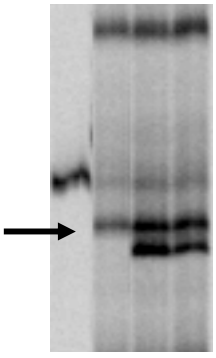
E51 M63 primer kombinasyonu Thatcher yakın izogenik hatlarda da incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.87'de verilmiştir. Şekle bakıldığında; 12 No'lu hatla birlikte 18 ve 26 numaralı hatlarda da incelenen bandın bulunduğu görülmektedir. Diğer hatlarda söz konusu bant saptanmamıştır.



1 2 3 4 5 6 7 8

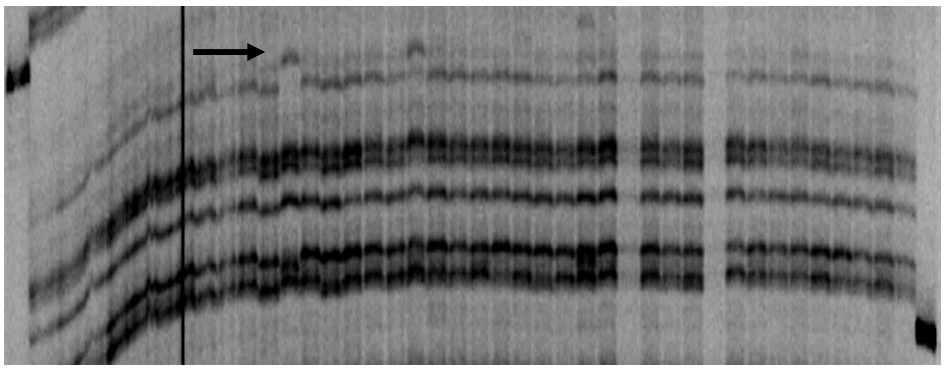
Şekil 4.88. E51 M63 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.

Şekil 4.88'de E51 M63 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında vermiş olduğu bant deseni görülmektedir. Aynı primer kombinasyonunun İzmir 85, 12 No'lu hat ile bunların F_1'inde incelenmesi sonucu elde edilen bant şablonu Şekil 4.89'da verilmiştir. Şekil incelendiğinde; hem ebeveynlerin hem de F_1'in araştırılan banda sahip olduğu görülmektedir.



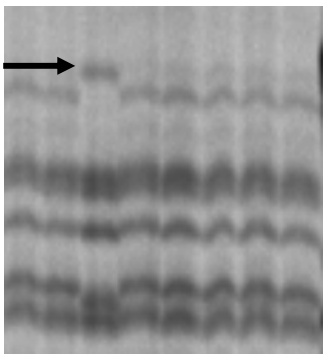
St İ 12 F_1

Şekil 4.89. E51 M63 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.



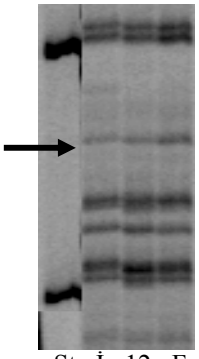
Şekil 4.90. E52 M63 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları.

364-400 bp standart DNA arasında polimorfik bant veren diğer bir primer kombinasyonu da E52 M63 kombinasyonudur. Şekil 4.90'da bu primer kombinasyonunun dayanıklı hatlarda göstermiş olduğu sonuçlar görülmektedir. Şekil 4.90 incelendiğinde polimorfik banda 12 No'lu hatla birlikte 18 No'lu hattın da sahip olduğu, ancak polimorfik bandın hemen altında bulunan bandın sadece 12 No'lu hatta bulunmadığı gözlenmektedir. Bu farklılık 12 No'lu hattı diğer hatlardan ayırmaktadır.

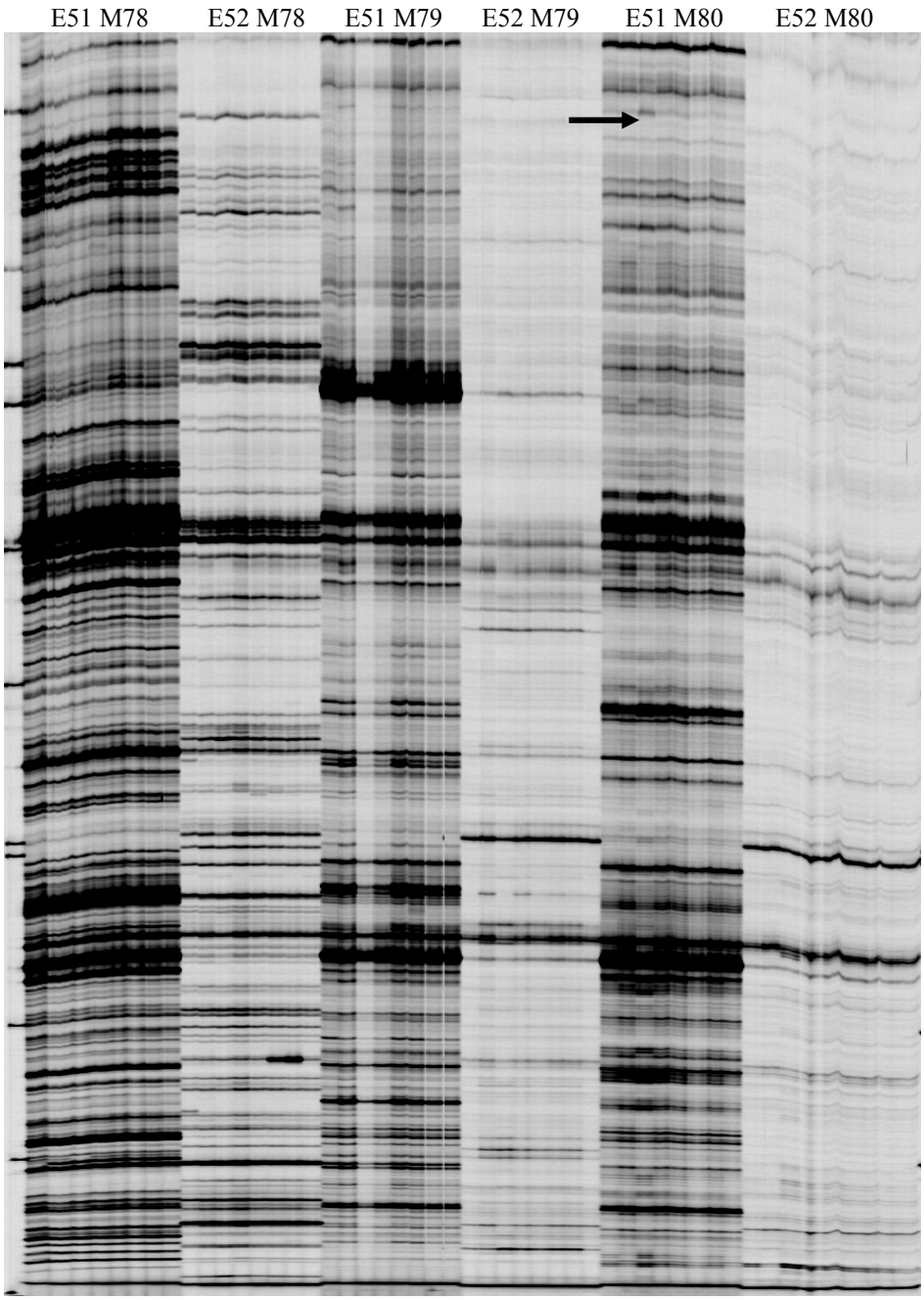


Şekil 4.91. E52 M63 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.

Şekil 4.91'de E52 M63 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında vermiş olduğu bant şablonu görülmektedir. Şekil 4.91 incelendiğinde; 3. örnek hariç tüm DNA ve DNA bulkları kendi içlerinde monomorfik bir banda sahiptirler. Ancak 3. örnek bu banda sahip olmayıp bu bandın hemen üstünde farklı bir bandı vermiştir. Bu nedenle bu primer kombinasyonu dayanıklı hatlarda da incelenmiş ve benzer sonuç elde edilmiştir. Aynı primer kombinasyonu İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların F_1'inde de incelenmiş ve elde dilen sonuçlar Şekil 4.92'de verilmiştir. Şekil 4.92 incelendiğinde; İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların F_1'inde söz konusu bandın bulunduğu dolayısı ile monomorfik bir bant olduğu görülmektedir.

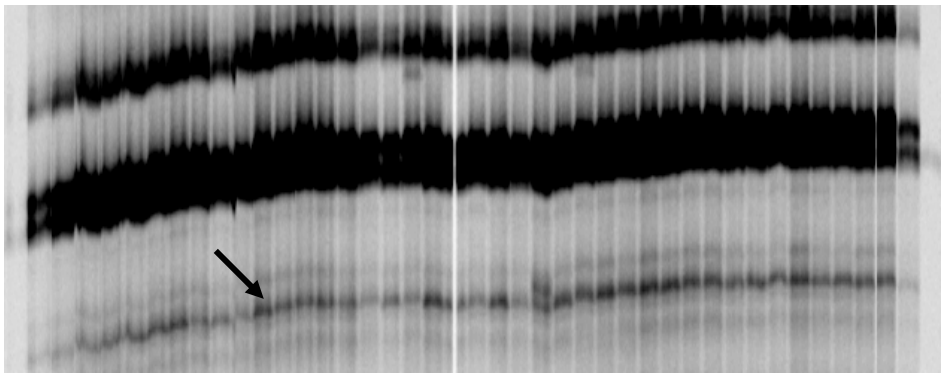


Şekil 4.92. E52 M63 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.



Şekil 4.93. E51-E52 primerlerinin M78-M79-M80 ile kombinasyonu.

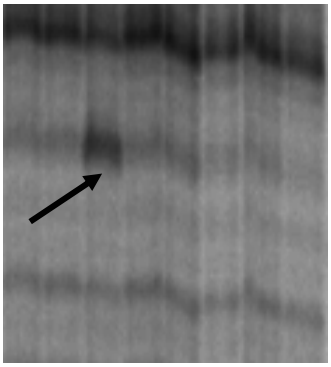
DNA ve DNA bulklarında incelenen E51-E52 primerlerinin M78-M79-M80 ile kombinasyonu sonuçları Şekil 4.93'de verilmiştir. İncelenen bu primer kombinasyonlarından E51 M80 kombinasyonu 460 bp standardı altında polimorfik bir bant göstermiştir.



Şekil 4.94. E51 M80 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları.

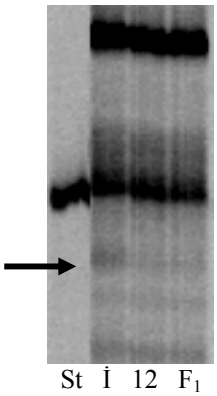
Şekil 4.94'de E51 M80 primer kombinasyonunun Thatcher yakın izogenik hatlarında vermiş olduğu sonuçları gösterilmiştir. Araştırılan 460 bp standardının altındaki polimorfik bandın 12 No'lu hatla birlikte incelenen yakın izogenik hatların tamamında bulunduğu gözlenmiştir. Dolayısı ile bu bant dayanıklı hatlarda monomorfik olarak belirlenmiştir.

DNA ve DNA bulklarında polimorfik bantlar elde edip daha sonra bu bantlara, bulkların oluşturulduğu hatlarda bakıldığında monomorfik gözlemek mümkündür. Çünkü 3. örnek tek bir hattı (12 No'lu hat) simgelemektedir. Halbuki 2, 4, 5, 6, 7 ve 8. örnekler farklı hatların DNA'larının bulunduğu bulkları temsil etmektedirler.

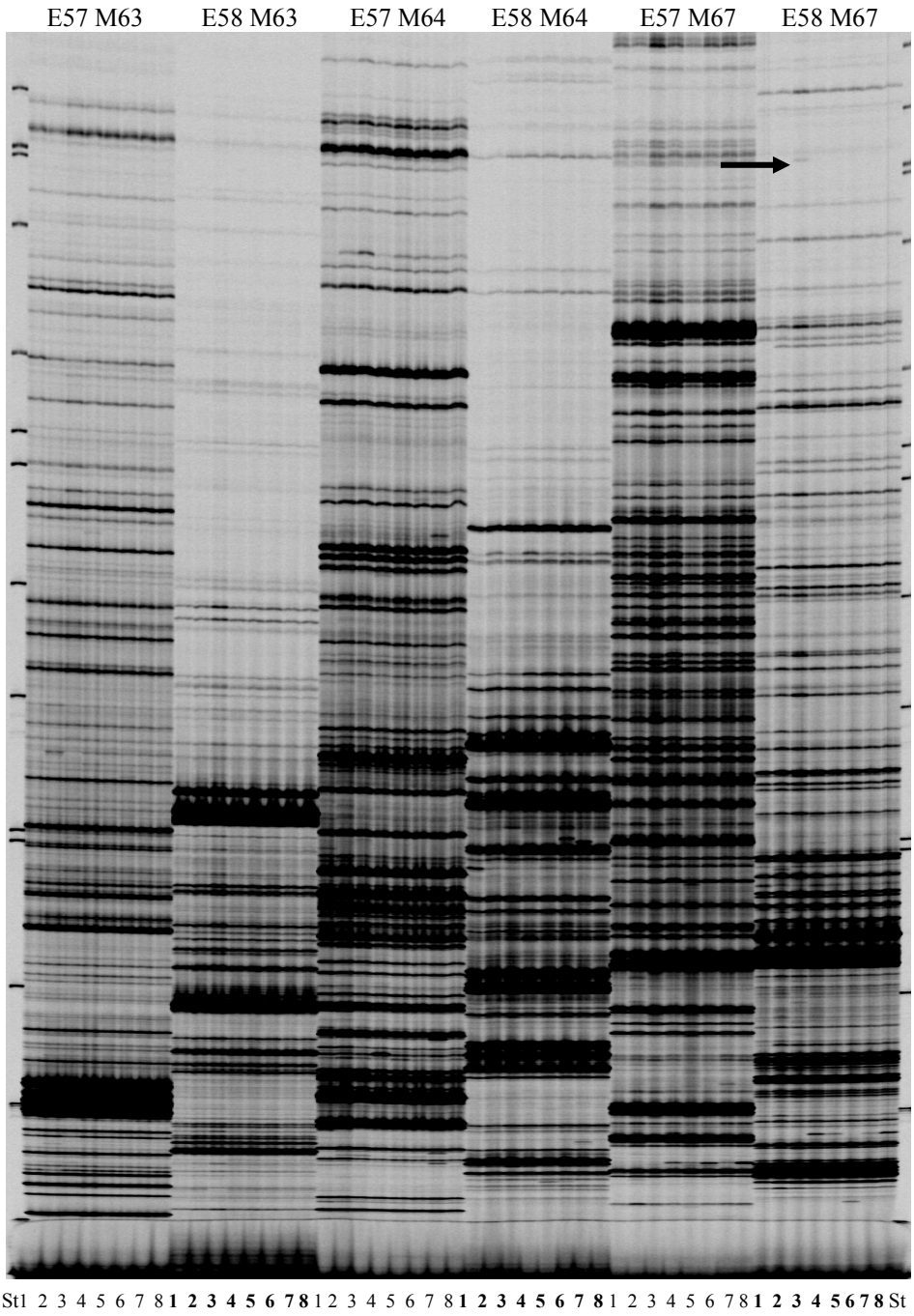


Şekil 4.95. E51 M80 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.

Şekil 4.95'de da E51 M80 primer kombinasyonunun bulklarda vermiş olduğu sonuç görülmektedir. E51 M80 primer kombinasyonunun bulklarda vermiş olduğu polimorfik bant İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların F_1'inde incelemek için aynı primer kombinasyonu ebeveynler ile F_1'de analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.96'da verilmiştir. Şekil incelendiğinde; aranan polimorfik bandın ebeveynler ile F_1'de monomorfik olduğu gözlenmiştir.

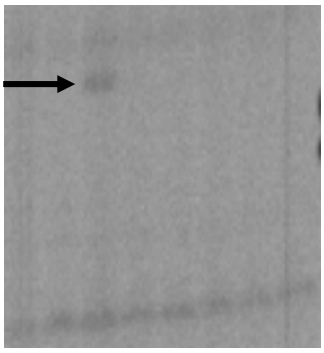


Şekil 4.96. E51 M80 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.



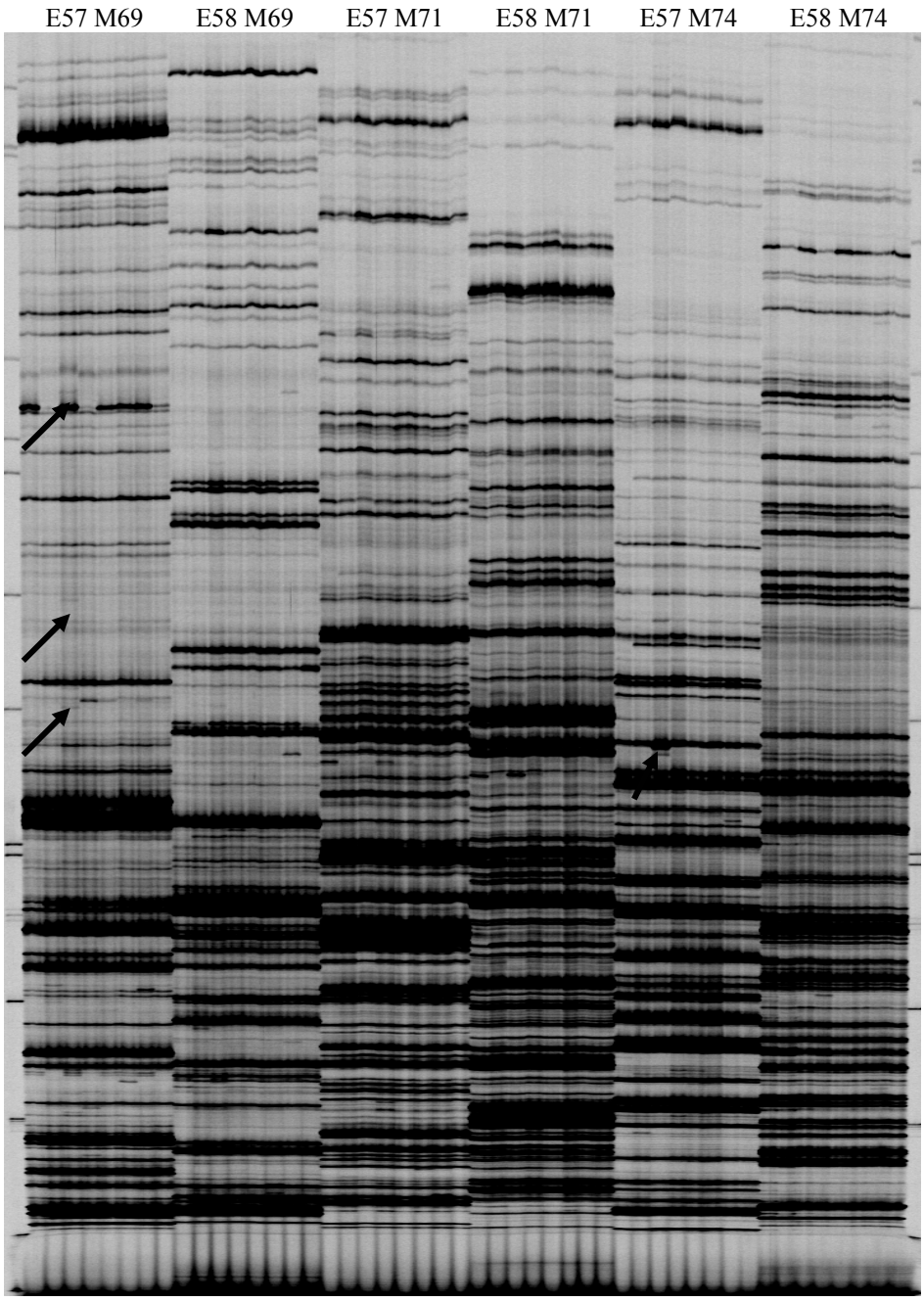
Şekil 4.97. E57-E58 primerlerinin M63-M64-M67 ile kombinasyonu.

Şekil 4.97'de E57 M63, E58 M63, E57 M64, E58 M64, E57 M67 ve E58 M67 AFLP primer kombinasyonlarının DNA ve DNA bulklarında vermiş olduğu sonuçlar görülmektedir. İncelenen kombinasyonlardan E58 M67 primer kombinasyonu 500 bp standart DNA segmentinin üstünde polimorfik bir bant sergilemiştir. Burada açık bir şekilde görülen bant hatlarda da incelenmek istenmiş ve elde edilen bant şablonundan ayırt edilemeyecek kadar silik gözlenmiştir. Bu nedenle E58 M67 primer kombinasyonunun hatlarda vermiş olduğu bant deseni burada verilmemiştir.



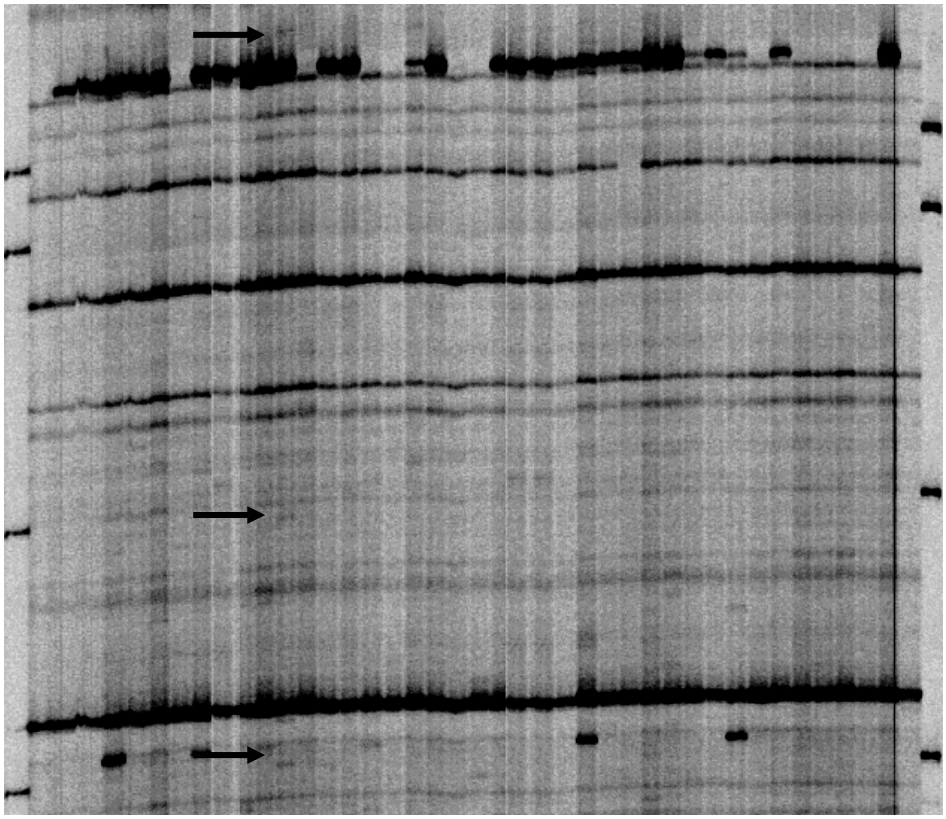
Şekil 4.98. E58 M67 primer kombinasyonunun bulklarda sonuçları.

E58 M67 primer kombinasyonunun bulklarda göstermiş olduğu sonuç Şekil 4.98'de daha yakından görülmektedir. Aynı primer kombinasyonu İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların F_1'inde de incelenmiş ancak bantlar gözlenememiştir. Araştırılan bant belirtildiği gibi bulklarda 500 bp standardı yakınlarında görülmüştür. Daha önce de belirtildiği gibi elektroforez işleminde bantların moleküler ağırlığı arttıkça gözlenme oranı azalmıştır.



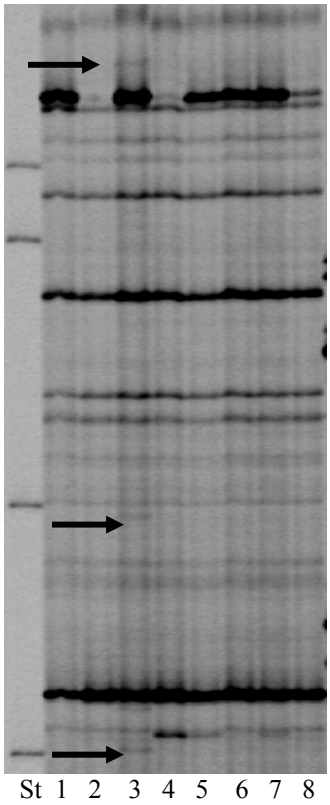
Şekil 4.99. E57-E58 primerlerinin M69-M71-M74 ile kombinasyonu.

Şekil 4.99'de DNA ve DNA bulklarında incelenen E57-E58 primerlerinin M69-M71-M74 ile kombinasyonu sonuçları verilmiştir. Bu primer kombinasyonlarından E57 M69 ve E57 M74 kombinasyonları 3. örnekte bantlar vererek polimorfik bant şablonları oluşturmuşlardır. E57 M69 primer kombinasyonu 255 bp, 300 bp yakınlarında ve 364-400 bp arasında üç farklı polimorfik bant deseni göstermiştir. Diğer bir primer kombinasyonu olan E57 M74 204-255 bp arasında yine bir polimorfik bant vermiştir.



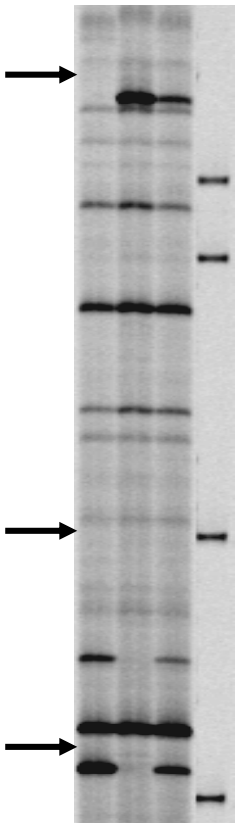
Şekil 4.100. E57 M69 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları.

E57 M69 primer kombinasyonunun hatlarda vermiş olduğu sonuçlar Şekil 4.100'de gösterilmiştir. Sırasıyla 255 bp, 300 bp yakınlarında ve 364-400 bp arasında üç farklı polimorfik görülmektedir. 255 bp ve 300 bp yakınlarında saptanan polimorfik bantlar 12 ve 29 No'lu hatlarda belirlenmiş diğer hatlarda gözlenmemiştir. 255 bp yakınında bulunan polimorfik bandın hemen üstünde bir başka bant görülmekte ve bu bant sadece 12 No'lu hatta bulunmaktadır. 364-400 bp arasında çıkan diğer bant ise 12 No'lu hatla birlikte 18 No'lu hatta da saptanmıştır.

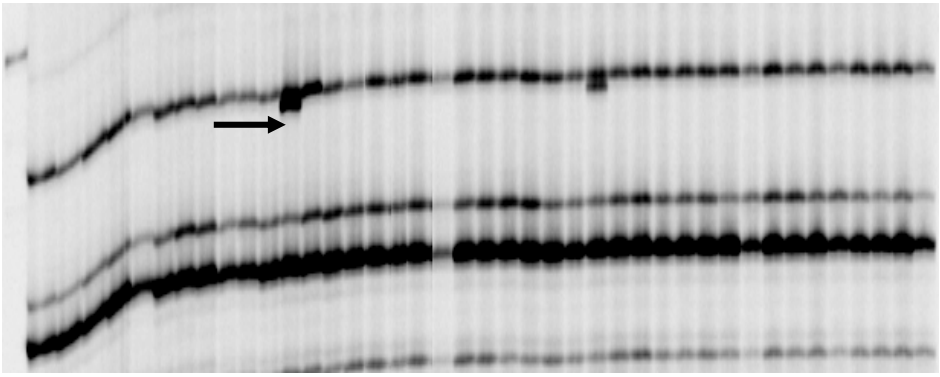


Şekil 4.101. E57 M69 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.

Şekil 4.101'de E57 M69 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında vermiş olduğu sonuçlar daha yakından görülmektedir. Aynı primer kombinasyonunun İzmir 85, 12 No'lu hat ile bunların F_1'inde incelenmesi sonucu elde edilen sonuçlar Şekil 4.102'de verilmiştir. 255 ve 300 bp yakınlarında beklenen ilk iki polimorfik bant ebeveynlerle birlikte F_1'de gözlenememiştir. 364-400 bp standartları arasında beklenen polimorfik bant ise ebeveynler ve melezde monomorfik olarak saptanmıştır.

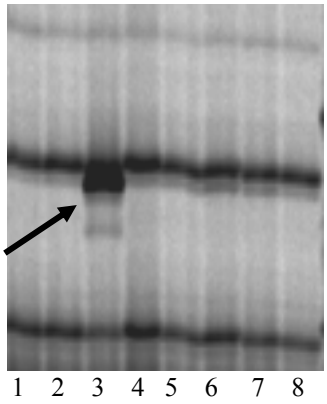


Şekil 4.102. E57 M69 primer kombinasyonunun ebeveynlerde ve F_1'deki sonuçları.



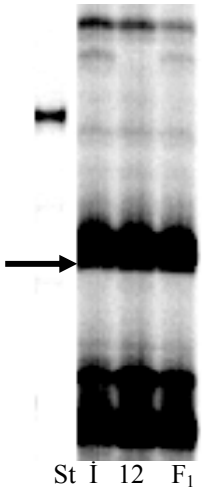
Şekil 4.103. E57 M74 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları.

Diğer polimorfik bant veren E57 M74 primer kombinasyonunun hatlarda incelenmesi sonucu yukarıdaki bant deseni elde edilmiştir (Şekil 4.103). 204-255 bp standartları arasında gözlenen polimorfik banda 12 No'lu hatla birlikte 26 No'lu hatta sahip olmuştur. Ancak 12 No'lu hattın polimorfik bandı daha kalın gözlenmiştir. Diğer hatlarda bu bant gözlenmemiştir.

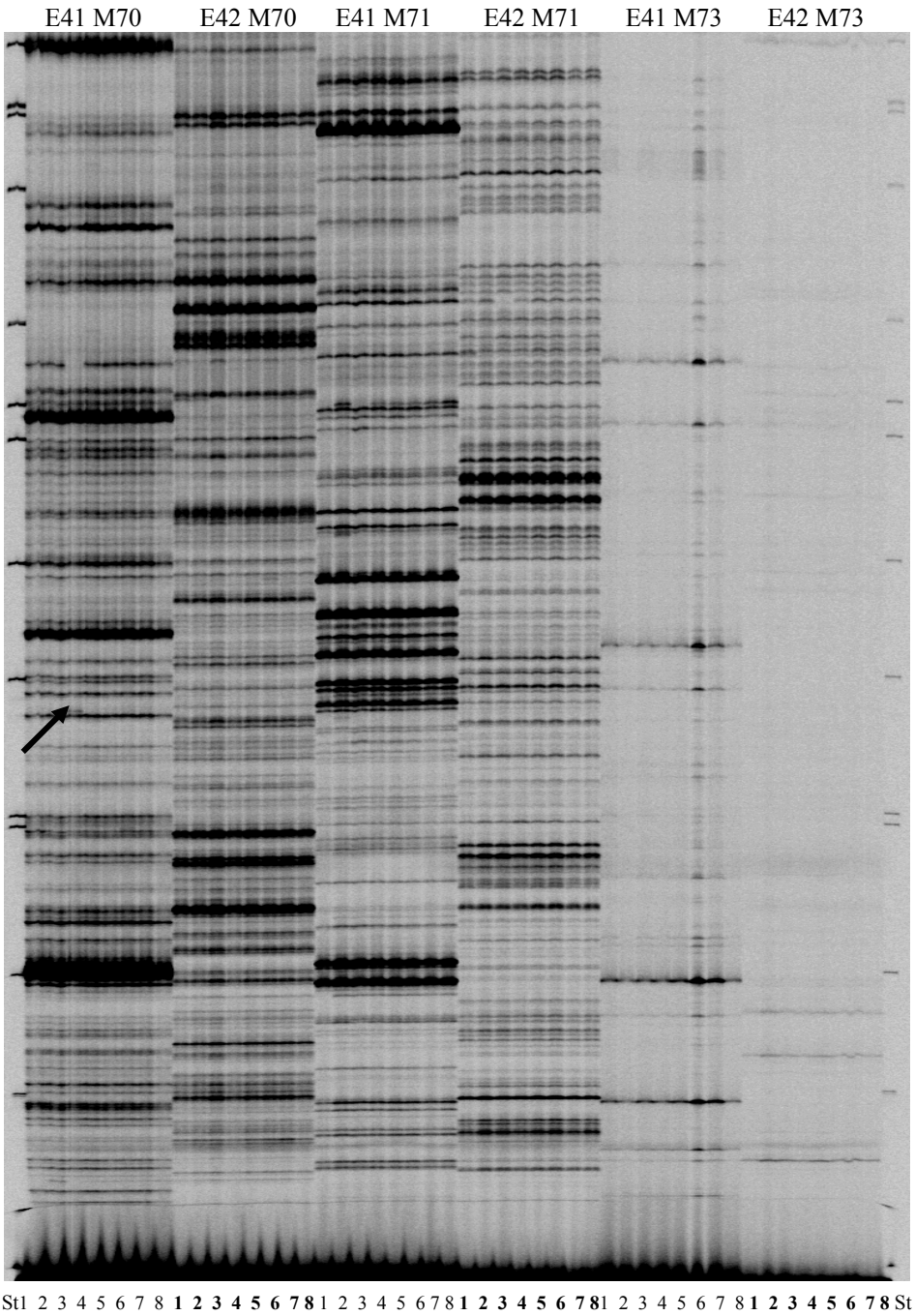


Şekil 4.104. E57 M74 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.

Şekil 4.104'de E67 M74 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında göstermiş olduğu polimorfik bant görülmektedir. Şekil incelendiğinde çok açık bir şekilde görülen bandın hemen altında başka bir bant gözlenmektedir. Aynı bant İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların F_1'inde incelenmiş ve Şekil 4.105'de gösterilmiştir. Şekle bakıldığında bu bant monomorfik olarak saptanmıştır. Çünkü incelenen bant melezle birlikte ebeveynlerde de belirlenmiştir.

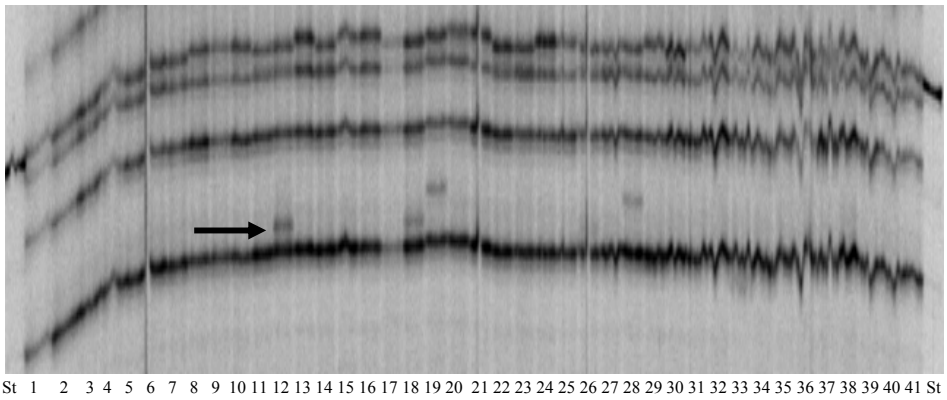


Şekil 4.105. E57 M74 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.



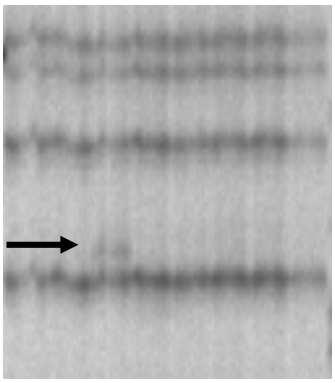
Şekil 4.106. E41-E42 primerlerinin M70-M71-M73 ile kombinasyonu.

Şekil 4.106'da E41 M70, E42 M70, E41 M71, E42 M71, E41 M73 ve E42 M73 primer kombinasyonlarının DNA ve DNA bulklarında vermiş olduğu sonuçlar görülmektedir. İncelenen AFLP primer kombinasyonlarından E41 M70 kombinasyonu 204-255 bp standart DNA segmentleri arasında polimorfik bir bant vermiştir. Diğer primer kombinasyonlarında polimorfik bant elde edilememiş, E41 M73 ve E42 M73 kombinasyonları neredeyse hiç bant vermemiştir.



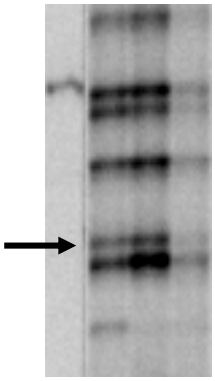
Şekil 4.107. E41 M70 primer kombinasyonunun hatlardaki sonuçları.

E41 M70 primer kombinasyonunun hatlarda vermiş olduğu sonuç Şekil 4.107'de gösterilmiştir. Şekil incelendiğinde 12 ve 18 No'lu hatlarda araştırılan polimorfik bandın bulunduğu, diğer hatlarda bu bandın olmadığı görülmektedir.



Şekil 4.108. E41 M70 primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında sonuçları.

Şekil 4.108'de E41 M70 AFLP primer kombinasyonunun DNA ve DNA bulklarında vermiş olduğu bant deseni daha yakından görülmektedir. 204-255 bp standart segmentleri arasında silik bir bant sadece 3. örnekte bulunmakta diğer DNA veya bulklarda görülmemektedir. Belirlenen polimorfik bant İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların F_1'inde incelenmiş ve E41 M70 primer kombinasyonunun ebeveynlerle F_1'de vermiş olduğu bant şablonu Şekil 4.109'da verilmiştir. Şekil 4.109 incelendiğinde; jele yükleme sırasında oluşan hatadan dolayı F_1'de bant desenleri net bir şekilde görülememekle birlikte ayırt edilebilmektedir. Ebeveynler ile F_1'e bakıldığında incelenen bandın bunların hepsinde görüldüğü ve monomorfik olduğu tespit edilmiştir.



St İ 12 F_1

Şekil 4.109. E41 M70 primer kombinasyonunun ebeveynler ve F_1'deki sonuçları.

Önemli özellikleri kodlayan genlere bağlı moleküler markörlerin belirlenmesinde kullanılan materyalden birisi de yakın izogenik hatlardır. Yakın izogenik hatlar sadece ilgilenilen gen ve komşu kromozomal bölgedeki allel grupları bakımından farklılık gösterirler. Bu nedenle iki yakın izogenik hat arasında fenotipik olarak gözlenen herhangi bir farklılığın nedeni sadece tek bir homozigot allelik farklılıktan kaynaklanır. Dolayısıyla bu iki izogenik hat arasında DNA seviyesinde saptanan herhangi bir polimorfizmin nedeni, büyük olasılıkla bu farklılığa sebep olan gen ya da DNA bölgesinin hedef gen ile çok yakın şekilde linkage durumunda olmasından kaynaklanmaktadır (Masojc, 2002).

AFLP tekniği ekmeklik buğdayın da içinde bulunduğu bitki genetiklerinde, genetik farklılığın değerlendirilmesi, yüksek yoğunlukta genetik haritaların oluşturulması gibi ve büyük genlerin belirlenmesi için bir markör kaynağı olarak çeşitli uygulamalarda önemli bir yere sahiptir

(Blaszczyk et al., 2005). Kahverengi pas dayanıklılık genlerini taşıyan Thatcher yakın izogenik hatlarında aday markörleri belirlemek için ^{PstI}AFLP tekniği etkili bir yöntemdir (Blaszczyk et al., 2005).

Bu çalışmada kahverengi pas dayanıklılık geni *Lr13*'e ait DNA markörlerini saptamak amacıyla Thatcher yakın izogenik hatlarından oluşturulan DNA ve DNA bulklarında, AFLP analizleri çerçevesinde toplam 246 farklı *Eco*RI/*Mse*I primer kombinasyonu incelenmiştir. Kullanılan primer kombinasyonları genellikle genotip başına 70-100 adet arasında amplifikasyon ürünü vermiştir. DNA ve DNA bulklarında incelenen primer kombinasyonlarından 28 adedi 12 No'lu hatta (3. örnek) toplam 33 farklı polimorfik bant deseni sergilemiştir (Çizelge 4.1). Bu primerlerin vermiş oldukları polimorfik bant sayısı 1 ile 3 arasında değişmiştir. Polimorfik bant veren bu primer kombinasyonları Thatcher yakın izogenik hatlarında ayrı ayrı tekrar incelenmiştir. Ayrıca İzmir 85 çeşidinin anne, 12 No'lu hattın baba olarak kullanıldığı melezin F_1 generasyonunda ve bu ebeveynlerde aynı primer kombinasyonları analiz edilmiş ve bant desenleri incelenmiştir.

Dayanıklı yakın izogenik hatlarda yapılan AFLP analizleri sonucu kullanılan primer kombinasyonlarının oldukça monomorfik bantlar sergilediği görülmüştür. DNA ve DNA bulklarında sadece 12 No'lu hatta polimorfizm oluşturan 28 AFLP primer kombinasyonundan E45 M68 ve E51 M80 kombinasyonları incelenen bantlar bakımından hatlarda monomorfik sonuçlar vermiş, 1 primer kombinasyonunda da (E58 M67) bant gözlenmemiştir. Geriye kalan 25 primer kombinasyonundan 6 adedinin (E34 M70, E45 M67, E43 M75, E49 M67, E47 M64 ve E57 M69) vermiş olduğu polimorfik bantlar sadece 12 No'lu hatta gözlenmiş

Çizelge 4.1. DNA ve DNA bulklarında polimorfizm oluşturan AFLP primer kombinasyonlarının dayanıklı yakın izogenik hatlarda, ebeveynlerde ve F_1 generasyonunda elde edilen sonuçları.

Primerler	Yakın İzogenik Hatlar	İzmir 85	12 No'lu hat	F_1
E32 M53	12, 18 ve 26 No'lu hatlar	+	+	+
E31 M56	12, 18 ve 26 No'lu hatlar	+	+	+
E32 M56	12 ve 18 No'lu hatlar	-	+	+
E39 M57	12 ve 18 No'lu hatlar	-	+	+
E33 M63	12 ve 18 No'lu hatlar	+	+	+
E32 M63 1. Bant (200-204)	12 ve 18 No'lu hatlar	+	+	+
2. Bant (300-350)	12 ve 18 No'lu hatlar	+	+	+
E32 M69	12, 18 ve 26 No'lu hatlar	-	+	+
E34 M70	12 No'lu hat	+	+	+
E34 M71 1. Bant (100)	12, 18 ve 28 No'lu hatlar	+	+	+
2. Bant (300)	12, 18 ve 26 No'lu hatlar	+	+	+
E45 M66	12, 18 ve 26 No'lu hatlar	Bant gözlenmemiştir		
E45 M67	12 No'lu hat	+	+	+
E45 M68	Bütün hatlarda	+	+	+
E43 M74	12 ve 18 No'lu hatlar	-	+	+
E43 M75	12 No'lu hat	+	+	+
E32 M74	12, 18 ve 26 No'lu hatlar	-	+	+
E49 M67	12 No'lu hat	+	+	+
E47 M69	12, 18 ve 26 No'lu hatlar	+	+	+
E47 M64 1. Bant (100)	12, 18 ve 26 No'lu hatlar	+	+	+
2. Bant (364)	12 No'lu hat	-	+	-
E47 M68	12, 26, 29 ve 33 No'lu hatlar	+	+	+
E49 M68	8,12,18,23 ve26 No'lu hatlar	+	+	+
E56 M71	12, 18 ve 26 No'lu hatlar	+	+	+
E51 M63	12, 18 ve 26 No'lu hatlar	+	+	+
E52 M63	12 ve 18 No'lu hatlar	+	+	+
E51 M80	Bütün hatlarda	+	+	+
E58 M67	Bant gözlenmemiştir	Bant gözlenmemiştir		
E57 M69 1. Bant (255)*	12 ve 29 No'lu hatlar	Bant gözlenmemiştir		

2. Bant (300)	12 ve 29 No'lu hatlar	Bant gözlenmemiştir		
3. Bant (364-400)	12 ve 18 No'lu hatlar	+	+	+
E57 M74	12 ve 26 No'lu hatlar	+	+	+
E41 M70	12 ve 18 No'lu hatlar	+	+	+

+: Araştırılan bant gözlenmiştir
-: Araştırılan bant gözlenmemiştir
*Araştırılan polimorfik bant 12 ve 29 No'lu hatlarda gözlenmiş ancak bu bandın hemen üstünde sadece 12 No'lu hatta bulunan başka bir bant elde edilmiştir.

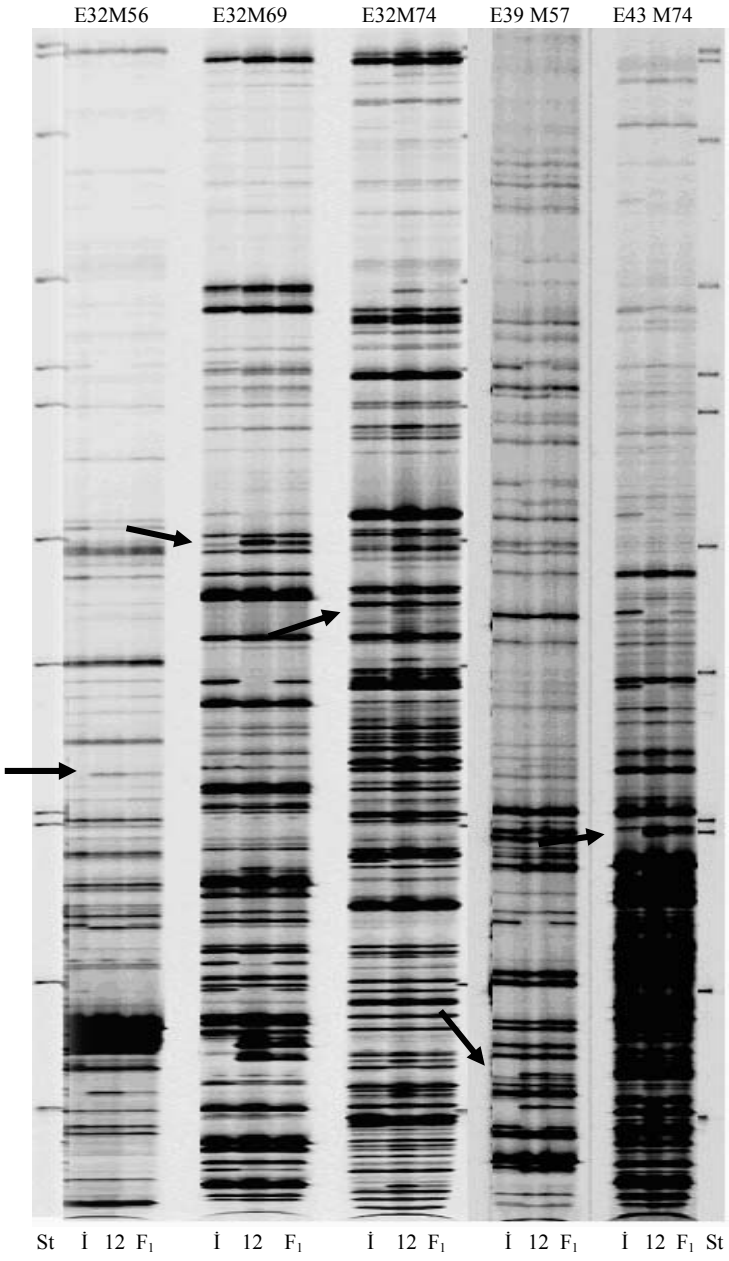
diğer hatlarda bant gözlenmemiştir. E52 M63 primer kombinasyonunun göstermiş olduğu polimorfik bant 12 ve 18 No'lu hatlarda gözlenmiş ancak polimorfik bandın hemen altında bulunan bir bant sadece 12 No'lu hatta elde edilmemiştir. Bunların dışındaki diğer primer kombinasyonları 12 No'lu hatla birlikte genellikle 18 ve 26 No'lu hatlar olmak üzere diğer dayanıklı hatlarda da aynı bandı göstermiştir (Çizelge 4.1). Chelkowski et al., (2003) *Lr28* geni için spesifik STS markörünü bu geni taşıyan Thatcher yakın izogenik hattı ile birlikte farklı dayanıklılık genleri taşıyan 21 yakın izogenik hatta da belirlemiştir.

Duyarlı ebeveyn İzmir 85, dayanıklı ebeveyn 12 No'lu hat ve bunlar arasında yapılan melezin F_1 generasyonunda, sadece DNA ve DNA bulklarında polimorfik bantlar veren primerler kullanılmış ve sadece bu bantlar bazında incelemeler yapılmıştır. Yapılan incelemeler sonucu; 28 adet primer kombinasyonunun vermiş olduğu toplam 33 polimorfik banttan 4 adet bant (3 adet primer kombinasyonu: E45 M66, E58 M67 ve E57 M69) ebeveynlerde ve F_1'de gözlenmemiştir. Ayrıca E47 M64 primerinin araştırılan 2. bandı ebeveynlerden sadece 12 No'lu hatta gözlenmiş İzmir 85 ile F_1'de bant elde edilmemiştir. Geriye kalan 24 primer kombinasyonundan 5 adedi ebeveynler ve F_1'de polimorfik sonuçlar vermiştir. E32 M56, E39 M57, E32 M69, E43 M74 ve E32 M74

olan bu primer kombinasyonları 12 No'lu hat ve F_1'de bant vermiş, aynı bant İzmir 85 çeşidinde saptanmamıştır (Çizelge 4.1). Bu primer kombinasyonlarının ebeveynler ile F_1'de vermiş oldukları bant desenleri bir bütün olarak Şekil 4.110'da verilmiştir. Polimorfik olarak belirlenen bantlar oklarla gösterilmiştir. Diğer 19 primer kombinasyonu ebeveynler ve F_1'de monomorfik bantlar vermiştir.

Ebeveynler ve F_1'de kullanılan primer kombinasyonları Şekil 4.110'da da görüldüğü gibi birden fazla polimorfik bant şablonu sergilemişlerdir. Primer kombinasyonu başına polimorfik bant sayısı 6'ya kadar çıkmıştır. Seyfarth et al., (2000a) *Lr13* dayanıklılık genine ait yeni markörleri belirmek için kullandıkları 226 adet *Sse*8387/*Mse*I AFLP primer kombinasyonundan 65'ini ebeveyn olarak kullandıkları Th*Lr13*, Frisal arasında ve bulklarda polimorfik bantlar verdiğini, polimorfik bant sayısının her primerde 3 ile 6 arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Polimorfizm oranı yüksek olmasına rağmen aynı polimorfik fragmentler F_2 populasyonunda incelendiğinde *Lr13*'e ait AFLP markörü tespit edememişlerdir.

Ancak bu çalışmada DNA düzeyindeki farklılıklar öncelikle dayanıklı yakın izogenik hatlar arasında incelenmiş ve bunlar arasında elde edilen polimorfik bantlar daha sonra ebeveynler ve F_1'de değerlendirilmiştir. Bu nedenle ebeveynler arasında polimorfik olan diğer bantlar yakın izogenik hatlar arasında monomorfik bantlardır ve *Lr13* ile bir ilişkisi olmayıp sadece ebeveynler arasında diğer özellikler bakımından farklılığın nedenidirler.



1: İzmir 85, 12: 12 No'lu hat, F_1: İzmir 85 x 12 No'lu hat

Şekil 4.110. E32M56, E32M69, E32M74 ve E39 M57 ve E43 M74 primer kombinasyonlarının ebeveynler ile F_1'deki sonuçları.

Ebeveynler ve F_1'de polimorfik bant deseni sergileyen 5 adet primer kombinasyonu, dayanıklı hatlardaki incelemeler sonucu sadece 12 No'lu hatta polimorfik bantlar veren primer kombinasyonları ile karşılaştırıldığında; ebeveynler ve F_1'de polimorfik bantlar veren 5 adet primer (E32 M56, E39 M57, E32 M69, E43 M74 ve E32 M74) Thatcher yakın izogenik hatlarında 12 No'lu hatla birlikte başka hatlarda da bant vermiştir. E32 M56, E39 M57 ve E43 M74 kombinasyonları 12 ve 18 No'lu hatlarda aynı bant desenini sergilemiştir. E32 M69 ve E32 M74 kombinasyonları ise 12, 18 ve 26 No'lu hatlarda ortak bant şablonu göstermiştir.

Diğer taraftan dayanıklı hatlarda yapılan analizler sonucu sadece 12 No'lu hatta bant veren E34 M70, E45 M67, E43 M75, E49 M67, E47 M64 ve E57 M69 primer kombinasyonları ebeveynler ve F_1'de incelendiğinde; E34 M70, E45 M67, E43 M75 ve E49 M67 kombinasyonları ebeveynler ve F_1'de monomorfik bant şablonları göstermiştir. Sadece E47 M64 kombinasyonunun 364 bp yakınlarında vermiş olduğu bant bakımından ebeveynler farklılık göstermiştir. 12 No'lu hatta saptanan bu bant İzmir 85 ve F_1'de gözlenmemiştir. E57 M69 kombinasyonunun incelenen bantları ebeveynler ile F_1'de gözlenememiştir.

Elde edilen sonuçlardan sadece 41 adet Thatcher yakın izogenik hattında yapılan incelemeler dikkate alındığında, E34 M70, E45 M67, E43 M75, E49 M67, E47 M64 ve E57 M69 primer kombinasyonun üzerinde durulması ve daha sonraki çalışmalarda yer verilmesi yararlı olacaktır. Çünkü bu kombinasyonlar farklı kahverengi pas dayanıklılık genleri taşıyan yakın izogenik hatlar arasında sadece, *Lr13* geninin

bulunduğu 12 No'lu hatta bant vererek polimorfizm oluşturmuşlardır.

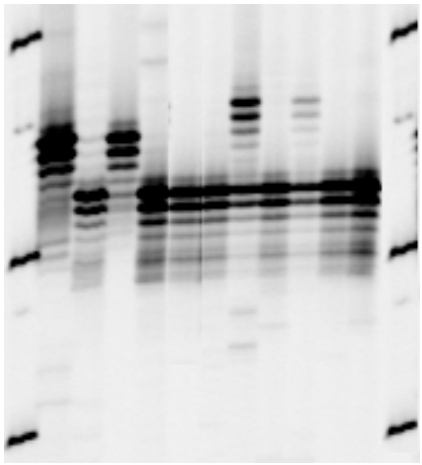
Ebeveynler ve F_1 generasyonunda yapılan AFLP analizleri dikkate alındığında 12 No'lu hatta ve F_1'de bant veren, duyarlı ebeveyn İzmir 85 çeşidinde aynı bandın gözlenmediği E32 M56, E39 M57, E32 M69, E43 M74 ve E32 M74 kombinasyonları göze çarpmaktadır. Ancak bu primerlerin incelenen bantları 12 No'lu hatla birlikte başka dayanıklı hatlarda da saptanmıştır. Bu nedenle *Lr13* genine aday markörler verebilecekleri düşünülmemelidir.

İzmir 85 kahverengi pasa duyarlı bir çeşittir. Ancak bu çeşidin hangi dayanıklılık genlerini taşımadığı bilinmemektedir ve İzmir 85 çeşidi ile *Lr13* geni arasında yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle İzmir 85 çeşidinde *Lr13* geninin bulunma olasılığı dikkate alınmalıdır. Çünkü kahverengi pas dayanıklılık genleri arasında *Lr13* büyük olasılıkla dünya çapında en çok dağılan gendir (McIntosh et al., 1995; Seyfarth, 2000b). Örneğin CIMMYT buğday varyetelerinin büyük bir kısmı *Lr13* genini taşımaktadırlar (Rajaram et al., 1988; Seyfarth, 2000b).

Buğdayın yabani akrabalarından ve çavdardan aktarılan *Lr* dayanıklılık genlerini taşıyan kromozom bölgelerini belirlemek için ^{PstI}AFLP tekniğinin buğdayda kullanışlı olduğunu belirten Blaszczyk et al. (2005), *Lr1, Lr9, Lr10, Lr13, Lr19, Lr21, Lr28* ve *Lr35* genlerine ait AFLP markörlerinin saptanmasında başarısız olmuşlar ve bunun nedenini az sayıda lokusun taranmasına (sadece 33 primer kombinasyonu kullanmışlar), *Lr* genlerini verici türlerin çok benzerlik göstermesine veya aktarılan kromozom segmentinin küçük boyutta olmasına bağlamışlardır.

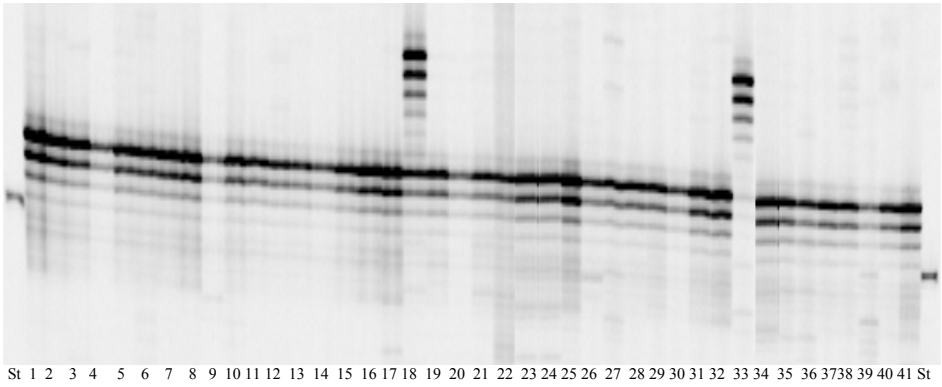
4.2. SSR Analizlerine Ait Bulgular

Çalışmada SSR primerleri olarak Wms 120, Wms 319, Wms 388, Wms 630, Wmc 104, Wmc 167 ve Wmc 177 kullanılmıştır. Bunlardan Wmc 104, Wmc 167 ve Wmc 177 primerleri sadece dayanıklı hatlarda incelenmiş ebeveynler ile melezde incelenmemiştir. O nedenle bu primerlerin bant desenleri burada verilmemiştir. Wms 120, Wms 319, Wms 388, Wms 630 primerleri ise İzmir 85, 12 No'lu hat, bunların F_1'inde, dayanıklı hatlardan oluşturulan DNA ve DNA bulklarında ve de dayanıklı hatlarda ayrı ayrı analiz edilmiştir. Bu primerlerin vermiş olduğu bant desenleri Şekil 4.111, Şekil 4.112, Şekil 4.113, Şekil 4.114, Şekil 4.115, Şekil 4.116, Şekil 4.117 ve 4.118'de verilmiştir.



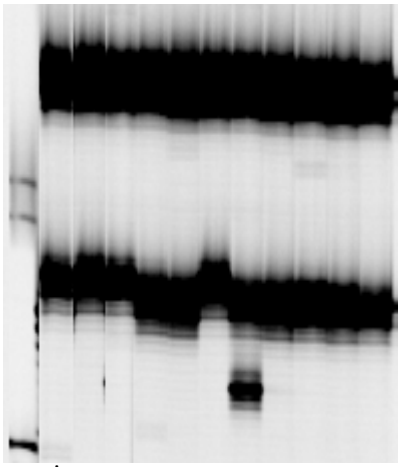
Şekil 4.111. Wms 120 primerinin ebeveynler, F_1 ve DNA ve DNA bulklarında sonuçları.

Şekil 4.111'de Wms 120 SSR primerinin sırasıyla İzmir 85, 12 No'lu hat, bunların F_1'i, DNA ve DNA bulklarında göstermiş olduğu bant deseni verilmiştir. Wms 120 primerinin vermiş olduğu bantlar 145-175 bp arasında saptanmıştır. Şekil incelendiğinde duyarlı çeşit İzmir 85 ile F_1'in aynı bant desenine sahip oldukları, dayanıklı 12 No'lu hattın ise farklı bir banda sahip olduğu görülmektedir. Ancak 12 No'lu hattın bant deseni dayanıklı hatlardan oluşturulan DNA ve bulklarla aynı gözlenmiştir. Sadece 4. sıradaki bulk farklı bir bant vermiştir.



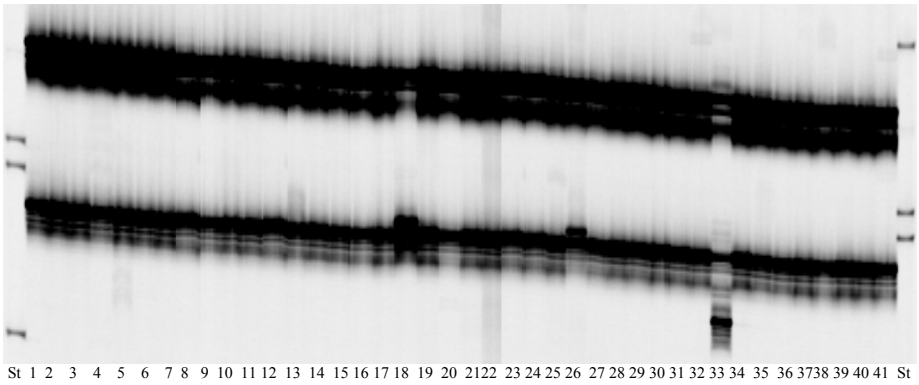
Şekil 4.112. Wms 120 primerinin dayanıklı hatlarda sonuçları.

Wms 120 primerinin Thatcher yakın izogenik hatlarda göstermiş olduğu sonuçlar Şekil 4.112'de verilmiştir. 18 ve 33 No'lu hatların dışındaki tüm hatlarda aynı bant şablonu gözlenmiştir. 18 ve 33 No'lu hatların bantlarının moleküler ağırlıkları diğer hatların bantlarından daha büyük gözlenmiştir. Ayrıca 18 No'lu hat diğer hatların bant verdiği noktada da bant vermiştir. 12 No'lu hatta bakıldığında diğer dayanıklı hatlardan farklı bir bant deseni sergilememiştir.



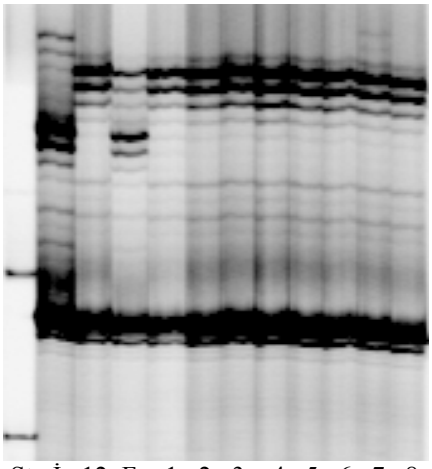
Şekil 4.113. Wms 319 primerinin ebeveynler, F_1 ve DNA ve DNA bulklarında sonuçları.

Şekil 4.113'de Wms 319 primerinin sırasıyla İzmir 85, 12 No'lu hat, bunların F_1'i, ve DNA ve DNA bulklarında vermiş olduğu bant deseni görülmektedir. Şekil 4.113 incelendiğinde; Wms 319 primeri 175-230 bp standartları arasında 2 bant vermiştir. Ayrıca genel olarak ebeveynler, F_1 ve bulklarda aynı bant şablonları elde edilmiş sadece 4. sıradaki bulkta farklı bir bant gözlenmiştir. Ebeveynler ile F_1'in vermiş olduğu ilk bant diğerlerinden daha yukarıda yani moleküler ağırlığı daha büyük görülmektedir. Bu nedenle bu primer dayanıklı hatlarda da incelenmiştir.



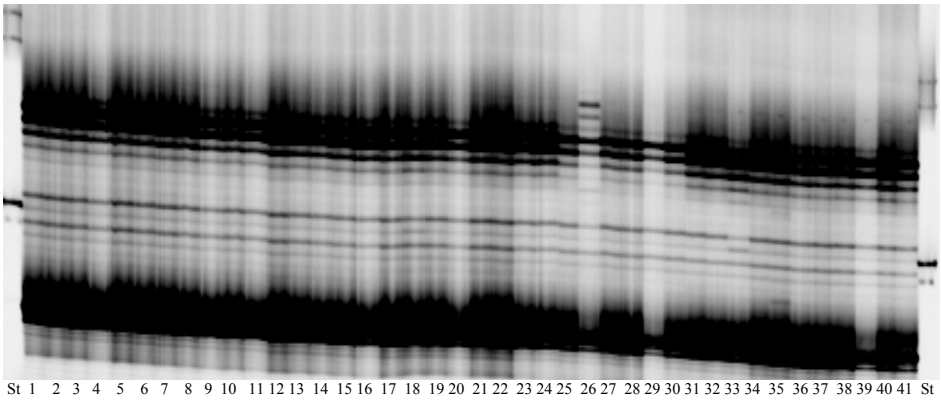
Şekil 4.114. Wms 319 primerinin dayanıklı hatlarda sonuçları.

Wms 319 primerinin dayanıklı hatlarda vermiş olduğu bant deseni Şekil 4.114'da gösterilmiştir. Wms 319 primeri ebeveynler, F_1 ve bulklarda olduğu gibi 2 farklı bant vermiştir. İncelenen hatlardan genel olarak sadece 33 numaralı hat farklı bir bant deseni sergilemiştir. Ayrıca 18 ve 26 numaralı hatlarda da farklılıklar gözlenmektedir. 12 No'lu hatta baktığımızda bu şekilde de farklı bir bant vermemiş diğer hatlarla ortak bant sergilemiştir.



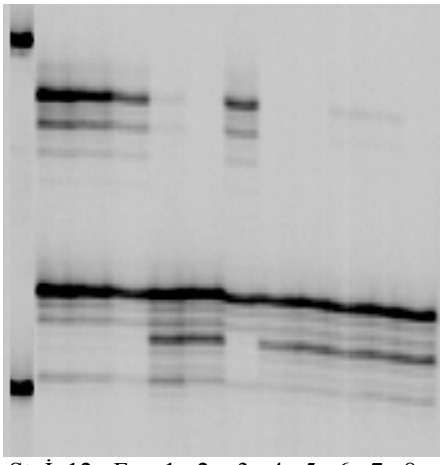
Şekil 4.115. Wms 388 primerinin ebeveynler, F_1 ve DNA ve DNA bulklarında sonuçları.

Wms 388 primerinin duyarlı ebeveyn İzmir 85, dayanıklı ebeveyn 12 No'lu hat, bunların F_1'inde ve dayanıklı yakın izogenik hatlardan oluşturulan DNA ve DNA bulklarında vermiş olduğu sonuçlar Şekil 4.115'de gösterilmiştir. Şekil incelendiğinde; Wms 388 primerinin 2 adet bant verdiği, İzmir 85 ile 12 No'lu hattın bant desenlerinin farklı olduğu görülmektedir. F_1'in bant deseninin duyarlı ebeveyn İzmir 85'e daha çok benzediği şekilden anlaşılmaktadır. Ayrıca 12 No'lu hat ile DNA ve DNA bulklarının vermiş olduğu bant desenleri arasında bir farklılık gözlenmemiştir.



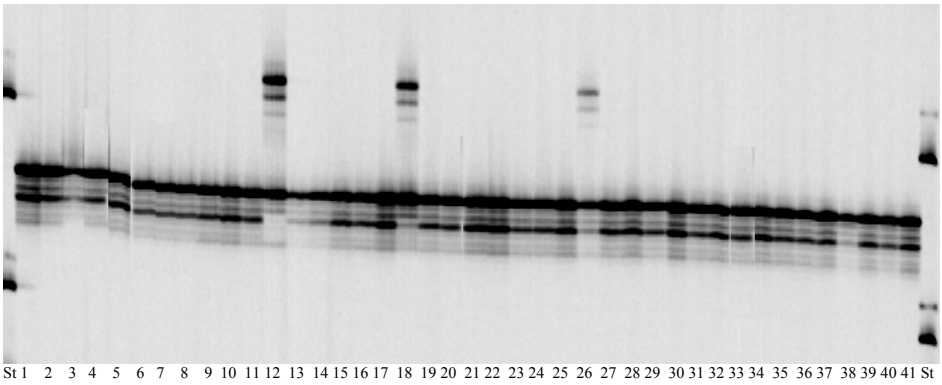
Şekil 4.116. Wms 388 primerinin dayanıklı hatlarda sonuçları.

Şekil 4.116'da Wms 388 primerinin Thatcher yakın izoegenik hatlarında vermiş olduğu sonuçları görülmektedir. Wms 388 primeri dayanıklı hatlarda da 2 adet bant vermiş ve bu bantlar 145-200 bp standart DNA segmentleri arasında gözlenmiştir. DNA ve DNA bulklarında da gözlendiği gibi dayanıklı hatların bant desenleri de birbirleriyle aynı elde edilmiştir. 12 No'lu hattın bant deseni diğer hatların bantlarıyla aynı gözlenmiştir.



Şekil 4.117. Wms 630 primerinin ebeveynler, F_1 ve DNA ve DNA bulklarında sonuçları.

Şekil 4.117'de Wms 630 SSR primerinin sırasıyla ebeveynler, bunların F_1'i, DNA ve DNA bulklarında göstermiş olduğu bant şablonu görülmektedir. Wms 630 primerinde elde edilen bant 120-145 bp standartları arasında gözlenmiştir. Şekil 4.117 incelendiğinde; duyarlı ebeveyn İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların F_1'inde bant desenlerinin benzer olduğu, diğer bulklarda ise farklı bantlar elde edildiği görülmektedir. Wms 630 primeri ebeveynler ile F_1'de 2 adet bant vermiş bulklarda ise tek bant vermiştir.



Şekil 4.118. Wms 630 primerinin dayanıklı hatlarda sonuçları.

Wms 630 primerinin Thatcher yakın izogenik hatlarında göstermiş olduğu bant şablonu Şekil 4.118'de verilmiştir. Şekil incelendiğinde; 12 No'lu hatla birlikte 18 ve 26 numaralı hatlar da diğer dayanıklı hatlardan farklı bant desenleri sergilemiştir. 12, 18 ve 26 numaralı hatların diğer hatlarla ortak birinci bantlarına bakıldığında; 18 ve 26 No'lu hatların birinci bantları diğer hatlarla aynı görülmektedir. 12 No'lu hattın diğer tüm hatlardan tek farkı ise diğer hatlarla ortak olan birinci banttaki bir DNA segmentinin olmamasıdır.

Daha önce de belirtildiği gibi Wms 120, Wms 319, Wms 388, Wms 630 primerleri Seyfarth et al., (2000a)'un çalışmasından yararlanılarak kullanılmıştır. Araştırıcılar dayanıklı ebeveyn Th*Lr13*, duyarlı ebeveyn Frisal ve bunların F_2 populasyonunda yapmış oldukları mikrosatelit analizlerinde 5 SSR primerini ebeveynler arasında polimorfik bulmuşlar, Wms 120, Wms 319, Wms 388, Wms 630 primerlerini *Lr13* geni ile linkage durumunda olduğunu saptamışlardır. Wms 630'un L*r13*'e en yakın lokalize olan primer olduğunu ve *Lr13*'den 10.7 cM uzaklıkta bulunduğunu belirlemişlerdir.

Bu çalışmada ebeveynlerle birlikte F_1'de ve Thatcher yakın izogenik hatlarında da incelenen bu SSR primerlerine baktığımız zaman; Wms 120 primeri ebeveynler arasında polimorfik bant deseni sergilemiş, F_1'in bant şablonu duyarlı ebeveyn İzmir 85 ile aynı gözlenmiş (Şekil 4.111) ve yakın izogenik hatlarla 12 No'lu hat aynı bant desenine sahip olmuştur (Şekil 4.112). Dolayısıyla ebeveynler arasında polimorfik bant deseni verse de, dayanıklı yakın izogenik hatlar arasında monomorfik bantlar verdiği için Wms 120 primerinin incelenen bu materyalde *Lr13* geni ile bir ilişkisi olmadığı saptanmıştır.

Wms 319 primeri ebeveynler arasında monomorfik bant vermiş, F_1'in bant deseni de ebeveynler ile aynı gözlenmiş (Şekil 4.113) ve 12 No'lu hat diğer yakın izogenik hatlarla aynı bant şablonuna sahip olmuştur (Şekil 4.114).

İncelenen diğer bir primer Wms 388 ebeveynler arasında polimorfik bant vermiş ve F_1'in bant deseni İzmir 85'le aynı sonucu göstermiştir (Şekil 4.115). Ancak yakın izogenik hatlar arasında yapılan incelemeler sonucu 12 No'lu hattın diğer tüm hatlarla aynı bandı verdiği görülmüştür (Şekil 4.116).

Wms 630 primer çifti ebeveynler arasında monomorfik bant vermiş ve F_1 generasyonu da ebeveynlerle aynı bant şablonunu göstermiştir (Şekil 4.117). Ancak Wms 630 primeri Thatcher yakın izogenik hatlarında incelendiğinde; 12 No'lu hattın diğer hatlardan farklı bir bant deseni verdiği görülmüştür (Şekil 4.118). 12 No'lu hattın bantları 18 ve 26 No'lu hatların bant desenine benzese de elde edilen SSR segmentlerinden bir tanesi 12 No'lu hattı bu iki hattan ayırt etmiştir.

Seyfarth et al., (2000a) kullandığı 14 mikrosatelit primerinden 5'ini Th*Lr13* x Frisal melezinin F_2 populasyonunda polimorfik bulmuş ve bunlardan 4'ünü *Lr13* geni ile linkage durumunda olduğunu saptamıştır. Aynı araştırıcılar aynı çalışmalarında Th*Lr13* x Thatcher melezini ve F_2 populasyonunu kullandıklarında, aynı SSR primerlerinin farklı sonuçlar verdiğini gözlemlemişlerdir. 14 mikrosatelit primerinden sadece 1'ini ebeveynler arasında polimorfik bulmuşlar ve sadece bu primerin *Lr13* ile linkage durumunda olduğunu belirlemişlerdir. Bu primer de Wms 630 primeridir.

İkinci populasyonda elde ettikleri bu farklılığın melezlenen ebeveynlerin yakın akraba olmalarından kaynaklandığını, çünkü bunların yakın izogenik hatlar olduğunu ve genomlarının %99'nun ortak olduğunu vurgulamışlardır (Seyfarth et al., 2000a).

Xgwm 630 markörünü kullanarak 8 çeşitte *Lr13* genini kontrol eden Greganova et al., (2003) elde ettikleri sonuçları fide döneminde yaptıkları inokülasyon sonuçları ile karşılaştırmışlar ve *Lr13* markörünü saptadıkları bir çeşitte hastalığın da ortaya çıktığını belirtmişlerdir. Bu farklılığı 2 nedene bağlamışlardır; ergin dönem dayanıklılığı sağlayan bir geni fide döneminde yapılan inokülasyonla belirlemenin zor olduğunu, *Lr13* geni ile kullanılan markör arasında 10.7 cM uzaklık bulunduğunu ve bu mesafenin ileriki çalışmalarda markörler yardımıyla seleksiyonda optimal olmadığını vurgulamışlardır. Mohan et al. (1997)'a göre bir markörün markörler yardımıyla seleksiyonda başarılı bir şekilde kullanılabilmesi için; ya gen ile o genin markörü birlikte açılma göstermeli ya da aralarındaki uzaklık 1 cM'dan az olmalıdır. Ancak *Xgwm 630* markörü gen bankasındaki buğday genetik kaynaklarının

incelenmesi için kullanılabilir (Greganova et al., 2003).

Yapılan SSR analizleri sonucu farklı kahverengi pas dayanıklılık genleri taşıyan Thatcher yakın izogenik hatları arasında 12 No'lu hattın farklılık gösterdiği tek primer Wms 630 primeridir. Wms 630 primeri ekmeklik buğdayın 2B kromozomunun kısa kolunda lokalize olmuştur (Röder et al., 1998b). Kullanılan ebeveynler arasında bu primer aynı bant desenini vermiştir. Duyarlı ebeveyn olarak kullanılan İzmir 85 çeşidinin *Lr13*'ü taşıma olasılığı yüksektir. Çünkü İzmir 85 çeşidi *Lr13*'ü taşıyan diğer ebeveyn 12 No'lu hatla aynı banda sahip olmuştur. Kahverengi pas dayanıklılık genleri arasında *Lr13* en yaygın bulunan gendir (McIntosh et al., 1995; Seyfarth, 2000b).

Bu çalışmada İzmir 85 x Tc*6 /Frontana (12 No'lu hat) melezi kullanılarak bunların F_1 generasyonunda ve Thatcher yakın izogenik hatlarında ergin dönem dayanıklılık geni olarak bilinen *Lr13*'e ait AFLP ve SSR markörleri araştırılmıştır. Türkiye ve Almanya'da yapılan kahverengi pas inokülasyon çalışmalarından olumlu sonuçlar alınamamıştır. Almanya'da *Lr13* genine avirülent ırkla çalışılmasına rağmen bitkiler yeterli dayanıklılık göstermemiştir. Nitekim Winzeler et al., (2000) Avrupa'da kahverengi pas dayanıklılığı için yalnız *Lr13* geninin yeterli olmadığını ancak *Lr13*'ün diğer dayanıklılık genleri ile kombinasyonunun çoğu pas patotipine dayanıklılık sağladığını belirtmiştir. Aynı şekilde Avustralya ve İngiliz buğday çeşitlerinde yapılan bir araştırmada *Lr1* ile *Lr13* geninin kombinasyonunun bir çeşitte fide dönemi dayanıklılığını sağladığı, farklı dört buğday çeşidinde ise ya *Lr13* geninin ya da *Lr13* ile linkage durumunda olan veya allelik olan bir başka genin fide dönemi dayanıklılığını oluşturduğu belirlenmiştir (Singh

et al., 2001). Liatukas (2003) *Lr13* geninin diğer genlerle kombinasyonunun buğdayda çoğu patotipe karşı dayanıklılık gösterdiğini belirtmiştir. Blaszczyk et al. (2004b) farklı dayanıklılık genleri taşıyan Avrupa buğday çeşitlerinde fide dönemi dayanıklılığını incelemişler ve *Lr13* geninin yalnız bulunduğu bir çeşidin kullandıkları bütün izolatlara karşı duyarlı olduğunu saptamışlardır.

Yaygın olarak kültürü yapılan çeşitlerde bulunan *Lr3, 10, 13, 26* ve *Lr34* dayanıklılık genleri *Lr26* hariç *T. aestivum*'dan alınmıştır. Ancak kültürü yapılan çeşitlerde çok sık bulunmayan genlerin kaynağı buğdayın yabani akrabalarıdır. Uzun bir adaptasyon süresinden dolayı bu genler tam bir dayanıklılık gösterirler (Liatukas, 2003).

Ergin dönem dayanıklılık genleri *Lr12, Lr13, Lr22a, Lr34, Lr35, Lr37*'nin etkinliği fide döneminde yüksek değildir bunun nedeni bu genlerin ekspresyonunun aslında ya da sadece ergin bitki döneminde ortaya çıkmasındandır. Örneğin *Lr13* geni önemsiz veya çok önemli olmayan bir gendir çünkü, ancak diğer genlerle kombine olduğu zaman birçok patojene karşı dayanıklılık sağlayabilir (Liatukas, 2003).

Bu çalışmanın asıl materyalini Thatcher yakın izogenik hatları oluşturmuştur. Her biri farklı kahverengi pas dayanıklılık geni taşıyan bu hatlarda yapılan DNA analizleri, Thatcher yakın izogenik hatlarında monomorfizm seviyesinin çok yüksek olduğunu göstermiştir. Bu nedenle bu hatlar içerisinde, *Lr13* genini taşıyan 12 No'lu hatta spesifik bantların elde edilmesi, bu bantların *Lr13* markörü olma olasılığını arttırmaktadır. Seyfarth et al. (2000b), yakın izogenik hatların düşük seviyede polimorfizm göstermelerine rağmen arzu edilen özelliklere bağlı

moleküler markörlerin saptanmasında kullanılan en iyi materyalden birisi olduğunu vurgulamıştır.

AFLP analizlerinde toplam 246 primer kombinasyonu kullanılmış, bunlardan 6 adedi (E34 M70, E45 M67, E43 M75, E49 M67, E47 M64 ve E57 M69) yakın izogenik hatlar arasından sadece 12 No'lu hatta bant vererek polimorfizm oluşturmuştur. Yapılan SSR analizlerinde toplam 7 adet mikrosatelit primeri kullanılmış, bunlardan 1 tanesi (Wms 630) yine sadece 12 No'lu hatta farklı bir bant deseni sergilemiştir. Bugüne kadar *Lr13* genine ait AFLP markörü tespit edilememiştir. Bundan sonraki *Lr13* geni ile ilgili çalışmalarda polimorfizm oluşturan bu 6 AFLP primeri üzerinde durulması ve *Lr13* geni ile tam olarak ilişkilerinin ortaya konması yararlı olacaktır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Dünya nüfusu hızla artmaktadır. Değişen çevre şartları artan nüfusun besin ihtiyacının karşılanmasını daha da önemli kılmaktadır. Bu nedenle bitkisel üretimde yeni çeşit geliştirmenin ve mevcut çeşitlerden en üstün olanını seçmenin önemi daha da artmıştır.

Buğday dünyada en çok yetiştirilen ve tüketilen gıda ürünüdür. Adaptasyon sınırlarının geniş olması, tanesinin uygun beslenme değeri, taşıma, saklama ve işlenmesindeki kolaylıklar buğdayı birçok ülkenin temel besin maddesi haline dönüştürmüştür. Bu sebeple buğday gerek dünya açlık probleminin çözümünde gerekse artan nüfusun besin gereksiniminin karşılanmasında ilk sıralarda yer almaktadır.

Dayanıklılık ıslahı içerisinde özellikle hastalıklara karşı dayanıklılık büyük önem taşımakta ve dünyada üretimin arttırılmasında ve kalitenin yükseltilmesinde büyük rol oynamaktadır. Buğdayda verim kayıplarına neden olan fungal hastalıklardan birisi de kahverengi pas hastalığıdır. Yaprak pası olarak da bilinen kahverengi pas genellikle çok büyük verim kayıplarına neden olmamakla birlikte dünya geneline bakıldığında kara ve sarı pastan daha büyük zararlar oluşturduğu görülmektedir (Samborski, 1985; Seyfarth, 2000b). Çünkü hastalık her yıl az veya çok görülmekte ve uzun yılların toplamı olarak büyük ürün kayıplarına neden olmaktadır (Onoğur, 1993; Arslan vd. 2002).

Lr13 buğdayda ergin dönem dayanıklılık geni olarak rol oynamaktadır. Buğdayın 2B kromozomunun kısa kolunda lokalize olmuştur ve *T. aestivum*'dan gelmektedir. Ergin dönemdeki bitki kahverengi pas saldırılarına çok maruz kalır, bu da çiçek sayısında

azalmalara ve verim kayıplarına neden olur. Fungus için büyüme ve gelişme şartlarının optimum olmasından dolayı ergin bitki döneminde inokülasyon yoğunluğu çok yüksektir. Ergin dönem dayanıklılık geni *Lr13*, dünyada çok geniş alanlara yayılmış kahverengi pas dayanıklılık genlerinden birisi olarak düşünülmektedir. Diğer dayanıklılık genleri ile kombinasyonu dayanıklılığı arttırmaktadır (Seyfarth, 2000b).

Kahverengi pasın neden olduğu kayıpları minimize etmek için dayanıklı çeşitlerin kullanımı hem en ekonomik ve hem de çevreye zarar vermeyen bir yoldur (Seyfarth, 2000b). Kimyasal kullanımı pahalı bir yoldur ancak genetik bir materyalin korunması amacıyla uygulanabilir. Bu nedenle dayanıklı ıslah çeşitlerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Son yıllarda biyoteknoloji alanındaki gelişmeler dayanıklılığı belirleyen gen ya da genleri saptayarak klasik bitki ıslahına büyük kolaylıklar sağlamıştır. Bu gelişmelerin ışığı altında CIMMYT'den temin edilmiş kahverengi pasa dayanıklı Thatcher yakın izogenik hatları, duyarlı çeşit İzmir 85 ve *Lr13* genini taşıyan 12 No'lu hat ile bunların arasında yapılan melezin F_1 generasyonu *Lr13* genine ait moleküler markörü saptamak amacıyla DNA analizleri yapılarak incelenmiştir. Belirtilen tüm bu materyalde AFLP ve SSR markör teknikleri kullanılmış *Lr13*'ne aday markörler saptanmıştır.

Thatcher yakın izogenik hatlarından oluşturulan DNA ve DNA bulklarında yapılan AFLP analizlerinde toplam 246 *Eco*RI/*Mse*I primer kombinasyonu kullanılmıştır. Bunlardan 28 adedi 12 No'lu hatta (*Lr13*) toplam 33 farklı polimorfik bant deseni sergileyerek polimorfizm

oluşturmuştur. Primer kombinasyonu başına polimorfik bant sayısı 1 ile 3 arasında değişmiştir.

DNA ve DNA bulklarının oluşturulduğu ve aralarında 12 No'lu hattın da bulunduğu 41 adet Thatcher yakın izogenik hattında polimorfizm oluşturan bu 28 primer kombinasyonu incelenmiştir. Elde edilen sonuçlardan E45 M68 ve E51 M80 primer kombinasyonları incelenen bant bakımından hatların tamamında bant vermiş ve monomorfik olarak saptanmıştır. E58 M67 kombinasyonun vermiş olduğu bant yakın izogenik hatlarda gözlenmemiştir. E34 M70, E45 M67, E43 M75, E49 M67, E47 M64 ve E57 M69 kombinasyonları incelenen hatlardan sadece 12 No'lu hatta bant vermiş diğer hatlarda bant gözlenmemiştir. Bunların dışında kalan 19 primer kombinasyonunun vermiş olduğu bantlar 12 No'lu hatla birlikte özellikle 18 ve 26 No'lu hatlarda ve diğer hatlarda da belirlenmiştir.

DNA ve DNA bulklarında sadece 12 No'lu hatta bant vererek polimorfizm oluşturan 28 primer kombinasyonu, duyarlı çeşit İzmir 85'in anne, 12 No'lu hattın baba ebeveyn olarak kullanıldığı melezin F_1 generasyonunda ebeveynlerle birlikte analiz edilmiştir. 3 primer kombinasyonunun (E45 M66, E58 M67 ve E57 M69) araştırılan bantları ebeveynlerde ve F_1'de gözlenememiştir. E47 M64 primer kombinasyonunun araştırılan 2. bandı sadece 12 No'lu hatta elde edilmiş, İzmir 85 ile F_1'de bant gözlenmemiştir. İncelenen E32 M56, E39 M57, E32 M69, E43 M74, E32 M74 kombinasyonlarının bantları 12 No'lu hat ve F_1'de gözlenmiş İzmir 85 çeşidinde saptanmamıştır. Geriye kalan 19 primer kombinasyonunun bantları ebeveynler ve F_1'de monomorfik bantlar olarak elde edilmiştir.

Thatcher yakın izogenik hatlarında sadece 12 No'lu hatta bant veren primer kombinasyonları ile ebeveynler ve F_1'de istenen bant desenini sergileyen primer kombinasyonları karşılaştırıldığında bunların farklı kombinasyonlar oldukları görülmüştür.

Çalışmanın SSR analizleri kısmında toplam 7 mikrosatelit primeri kullanılmıştır. DNA ve DNA bulklarında yapılan analizler sonucu bunlardan Wms 319 ve Wms 630 primer çifti 12 No'lu hatta polimorfik bant vermiştir. Aynı primerler Thatcher yakın izogenik hatlarında incelendiğinde; Wms 319'un hatlarda monomorfik bant verdiği, Wms 630 primerinin 12 No'lu hatla birlikte 18 ve 26 No'lu hatlarda farklı bant deseni sergilediği saptanmıştır. Ancak 18 ve 26 No'lu hatlarda elde edilen bant segmentlerinden bir tanesi 12 No'lu hatta gözlenmemiştir. Wms 319 ve Wms 630 primerleri ebeveynler ve F_1'de monomorfik bant şablonu sergilemiştir.

İncelenen diğer mikrosatelit primerlerinden Wms 120 ve Wms 388'in vermiş olduğu bantlar ebeveynlerde farklılık göstermiş, F_1'in bant deseni İzmir 85 çeşidiyle aynı elde edilmiştir. Ancak bu primerler kullanılarak DNA ve DNA bulkları ile birlikte yakın izogenik hatlarda monomorfik bant deseni elde edilmiştir.

Yapılan AFLP ve SSR analizleri dikkate alındığında; sadece 12 No'lu hatta spesifik bantlar veren 6 adet AFLP primer kombinasyonu (E34 M70, E45 M67, E43 M75, E49 M67, E47 M64 ve E57 M69) ile mikrosatelit primeri Wms 630 üzerinde durulmalıdır. Wms 630 primeri daha önceki bir çalışmada *Lr13* geni markörü olarak belirlenmiştir. Ancak bugüne kadar *Lr13*'e ait bir AFLP markörü saptanamamıştır. Bu çalışma ile E34 M70, E45 M67, E43 M75, E49 M67, E47 M64 ve E57

M69 kombinasyonları, *Lr13* genine ait markörü saptamada aday primer kombinasyonları olarak belirlenmiştir. Diğer bir ifade ile bu kombinasyonların verdiği bantlar *Lr13* genine aday markörlerir. Bundan sonraki *Lr13* geni ile yapılan çalışmalarda özellikle de Thatcher yakın izogenik hatlarının dahil edildiği araştırmalarda bu AFLP primer kombinasyonları üzerinde durulması, *Lr13* geni ile ilişkisinin tam olarak ortaya konması yararlı olacaktır.

Sonuç olarak; bu çalışmada kahverengi pas dayanıklılık geni *Lr13*'e ait AFLP ve SSR markörleri araştırılmış ve aday AFLP markörleri belirlenmiştir. Ekmeklik buğdayda AFLP ve SSR tekniklerinin kahverengi pas dayanıklılık genlerini araştırmada yararlı olduğu saptanmıştır. Ayrıca 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 sağladığı kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Agrios, G. N., 1997, Plant Pathology, Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto.

Altay, F., 1980, Kahverengi Pasa Mukavemet Kaynakları ve Islahı, Bitki Islahı Simpozyumu, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Yayınları, NO:17/41, Menemen-İzmir 240-217.

Anonim, 2007a, Thatcher wheat, http://grain.jouy.inra.fr/cgi-bin/graingenes/report.cgi?class=germplasm;name=THATCHER;show=synonym.

Anonim, 2007b, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Web sayfası, http://www.etae.gov.tr/etae-uretim/bugday.htm.

Arslan, Ü., Yağdı, K. ve Aydoğan, E., 2002, Bursa ili ekolojik koşullarında buğday kahverengi pası (*Puccinia recondita* Roberge ex Desmaz. f.sp. *tritici*)'na karşı bazı ekmeklik buğdayların reaksiyonları ve verim kayıplarının belirlenmesi, Ulud. Üniv. Zir. Fak. Derg. 16:201-210.

Arumuganathan, K. and Earle, E. D., 1991, Nuclear DNA content of some important plant species, Plant Mol. Biol. Reporter 9: 208-218.

Autrique, E., Singh, R. P., Tanksley, S.D. and Sorrells, M.E., 1995, Molecular markers for four leaf rust resistance genes introgressed into wheat from wild relatives. Genome 38:75-83.

Bennetzen, J. L. and Jones, J. D. G., 1992, Approaches and progress in the molecular cloning of plant disease resistance genes, New York: Plenum Press.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Blaszczyk, L., Chelkowski, J., Korzun, V., Kraic, J., Ordon, F., Ovesna, J., Purnhauser, L., Tar, M. and Vida, G., 2004a, Verification of STS markers for leaf rust resistance genes of wheat by seven European laboratories, Cellular & Molecular Biology Letters Volume 9:805 -817.

Blaszczyk, L., Goyeau, H., Huang, X., Röder, M., Stepien, L., and Chelkowski, J., 2004b, Identifying leaf rust resistance genes and mapping gene *Lr37* on the microsatellite map of wheat, Cellular & Molecular Biology Letters 9:869 – 878.

Blaszczyk, L., Tyrka, M. and Chelkowski, J., 2005, ^{Pst1}AFLP based markers for leaf rust resistance genes in common wheat, J. Appl. Genet. 46(4):357-364.

Boyraz, N. ve Delen, S., 2005, Bitkilerin hastalıklara karşı dayanıklılığında konukçu enzimlerin rolü, S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi 19 (35):51-59.

Chelkowski, J. and Stepien, L., 2001, Molecular markers for leaf rust resistance genes in wheat. J. Appl. Genet. 42:117-126.

Chelkowski, J., Golka, L. and Stepien, L., 2003, Application of STS markers for leaf rust resistance genes in near-isogenic lines of spring wheat cv. thatcher, J. Appl. Genet. 44(3):323-338.

Chester, K. S., 1946, The Nature and Prevention of the Cereal Rusts as Exemplified in the Leaf Rust of Wheat.Waltham, MA: Chronica Botanica. 169 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Collard, B. C. Y., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B. and Pang, E. C. K., 2005, An introduction to markers, Quantitative Trait Loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts, Euphytica 142:169–196.

Curtis, B. C., Rajaram, S. and Macpherson, H. G., 2002, Bread wheat, FAO corporate document repository, http://www.fao.org.

Crute, I. R., 1986, Investigaions of gene-for-gene relationships: The need for genetic analyses of both host and parasite, Plant Pathology 35: 15-17.

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

Dieguez, M. J., Altieri, E., Ingala, L. R., Perera, E., Sacco, F. and Naranjo, T., 2006, Physical and genetic mapping of amplified fragment length polymorphisms and the leaf rust resistance *Lr3* gene on chromosome 6BL of wheat, Theor. Appl. Genet. 112:251–257.

Doyle, J. F. and Doyle, A., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, Phytochem. Bull. 19:11-15.

Duke, J. A., 1983, *Triticum aestivum* L., Poaceae, Common wheat, Bread wheat, Handbook of Energy Crops, unpublished.

Ellingboe, A. H., 1984, Genetics of host-parasite relations: An essay, advances in plant pathology 2: 131-152.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Ezzahiri, B. and Roelfs, A. P., 1989, Inheritance and expression of adult plant resistance to leaf rust in Era wheat, Plant Dis. 73:549-551.

FAOSTAT, 2007, Database Results.

Feuillet, C., Messmer, M., Schachermayr, G. and Keller, B., 1995, Genetical and physical characterization of the *Lr1* leaf rust resistance locus in wheat (*Triticum aestivum* L.), Mol. Gen. Genet. 248: 553-562.

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, April, 1(2):35-40.

Greganova, Z., Kraic, J. and Galova, Z., 2003, Diagnostic of wheat leaf rust resistance genes by DNA markers and their application in MAS, Czech J. Genet. Plant Breed., 39(4): 127–129.

Gupta, P., Varshney, R., Sharma, P. and Ramesh, B., 1999, Molecular markers and their applications in wheat breeding, Plant Breed. 118: 369-390.

Gupta, P. K., Balyan, H. S., Edwards, K. J., Isaac, P., Korzun, V., Röder, M., Gautier, M.-F., Joudrier, P., Schlatter, A. R., Dubcovsky, J., De la Pena, R. C., Khairallah, M., Penner, G., Hayden, M. J., Sharp, P., Keller, B., Wang, R. C. C., Hardouin, J. P., Jack, P. and Leroy, P., 2002**,** Genetic mapping of 66 microsatellite (SSR) loci in bread wheat, Theor. Appl. Genet. 105:413-422.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Gupta, S. K., Charpe, A., Prabhu, K. V. and Haque, Q. M. R., 2006, Identification and validation of molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr19* in wheat, Theor. Appl. Genet. 113:1027–1036.

Hazen, S. P., Leroy, P. and Ward, R. W., 2002, AFLP in *Triticum aestivum* L.: patterns of genetic diversity and genome distribution, Euphytica 125:89–102.

Helguera, H., Khan, I. A. and Dubcovsky, J., 2000, Development of PCR markers for the wheat leaf rust resistance gene *Lr47*, Theor. Appl. Genet. 100:1137–1143.

Hoisington, D., Bohorova, N., Fennell, S., Khairallah, M., Pellegrineschi, A. and Ribaut, J. M., 2002, The application of biotechnology to wheat improvement, FAO Corporate Document Repository, http://www.fao.org.

Hussien, T., Bowden, R. L., Gill, B. S. and Cox, T. S., 1998, Chromosomal locations in common wheat of three new leaf rust resistance genes from *Triticum Monococcum*, Euphytica 101:127–131.

İncirli, A. and Akaya, M. S., 2001, Assessment of genetic relationships in durum wheat cultivars using AFLP markers, Genetic Resources and Crop Evolution 48: 233–238.

Johnston, C. O., 1931, Effect of leaf rust infection on yield of certain of wheat, Journal of the The American Society of Agronomy 23.

Jones, N., Ougham, H. and Thomas, H., 1997. Markers and mapping: we are all geneticists now, New Phytol. 137: 165–177.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Kaur, M., Saini, **R.G. and Preet, K.,** 2000, Adult plant leaf rust resistance from 111 wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars, Euphytica 113:235–243.

Kazan, K. ve Gürel, E., 2001, Hastalıklara dayanıklılığın arttırılması. Bitki Biyoteknolojisi II, Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, S. Özcan, E. Gürel ve M. Babaoğlu. Selçuk Üniversitesi Yayınları, Konya.

Khan, R. R., Bariana, H. S., Dholakia, B. B., Naik, S. V., Lagu, M. D., Rathjen, A. J., Bhavani, S. and Gupta, V. S., 2005, Molecular mapping of stem and leaf rust resistance in wheat, Theor. Appl. Genet. 111:846–850.

Kolmer, J. A., 1996, Genetics of resistance to wheat leaf rust, Annu. Rev. Phytopathol. 34:435-55.

Kolmer, J. A., 2001, Molecular polymorphism and virulence phenotypes of the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* in Canada, Can. J. Bot. 79: 917–926.

Kolmer, J. A., 2003, Postulation of leaf rust resistance genes in selected soft red winter wheats, Crop Sci. 43:1266-1274.

Korzun, V., 2002a, Use of moleculer markers in cereal breeding, Cellular & Molecular Biology Letters 7:811-820.

Korzun, V., 2002b, Moleculer markers and their applications in cereal breeding, Marker assisted selection: A fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding? Session I: MAS in plants, http://www.fao.org/BIOTECH/docs/Korzun.pdf.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Kün, E., 1981, Serin İklim Tahılları. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Ders Notları.

Leonova, I. N., Röder, M. S., Budashkina, E. B., Kalinina, N. P. and Salina, E. A., 2002, Molecular analysis of leaf rust-resistant ıntrogression lines obtained by crossing of hexaploid wheat *Triticum aestivum* with tetraploid wheat *Triticum timopheevii,* Russian Journal of Genetics 38:1397–1403.

Leonova, I., Börner, A., Budashkina, E., Kalinina, N., Unger, O., Röder, M. and Salina, E., 2004, Identification of microsatellite markers for a leaf rust resistance gene ıntrogressed into common wheat from *Triticum Timopheevii,* Plant Breeding 123:93-95.

Liatukas, Z., 2003, Virulence of winter wheat leaf rust isolates, Biologija 1:77-80.

Lindsay, J. P., Lamb, C. J. and Dixon, R. A., 1993, Microbial recognition and activation of plant defense systems, Trends in Microbiology 4: 181-187.

Ling, H.Q., Qiu, J., Singh, R. P. and Keller, B., 2004, Identification and genetic characterization of an *Aegilops tauschii* ortholog of the wheat leaf rust disease resistance gene *Lr1*, Theor. Appl. Genet. 109:1133–1138.

Lipps, P. E., 2006, Ohio State University, Extension FactSheet, Plant Pathology, http://ohioline.osu.edu./ac-fact/0006.html

Marsalis, M. A. and Goldberg, N. P., 2006, Leaf, stem and stripe rust diseases of wheat, New Mexico State University, Guide A-415, http://cahe.nmsu.edu/pubs/_a/A-415.pdf.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Masojc, P., 2002, The application of molecular markers in the process of selection, Cellular & Molecular Biology Letters 7:499 – 509.

McIntosh, R. A., Wellings, C. R. and Park, R. F., 1995, Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes. CSIRQ Australia/Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

McIntosh, R. A., Hart, G. E., Devos K. M., Galem, D. and Rogers, W. J., 1998, Catalogue of gene symbols for wheat, Proc. 9th Intern. Wheat Genet. Symp., Saskatchewan, Canada, V.5:235.

McIntosh, R. A., Appels, R., Devos, K.M., Dubcovsky, J., Rogers, W.J. and Yamazaki, Y., 2003, Catalogue of gene symbols for wheat, Proc. 10TH Intern. Wheat Genet. Symp. Paestum Italy.

Messmer, M. M., Seyfarth, R., Keller, M., Schachermayr, G., Winzeler, M., Zanetti, S., Feuillet, C. and Keller, B., 2000, Genetic analysis of durable leaf rust resistance in winter wheat, Theor. Appl. Genet. 100:419–431.

Michelmore, R.W., Paran, I. and Kesseli, R.V., 1991, Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9828-9832.

Mohan, M., Nair, S., Bhagwat, A., Krishna, T. G., Yano, M., Bhatia, C. R. and Sasaki, T., 1997, Genome mapping, moleculer markers and marker-assisted selection in crop plants, Molecular Breeding 3:87-103.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Naik, S., Gill, K. S., Prakasa Rao, V. S., Gupta, V. S., Tamhankar, S. A., Pujar, S., Gill, B. S. and Ranjekar, P. K., 1998, Identification of a STS marker linked to the *Aegilops speltoides*-derived leaf rust resistance gene *Lr28* in wheat, Theor. Appl. Genet. 97: 535–540.

Nemli, T., 2000, Tarla Bitkileri Hastalıkları, Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Ders Notları, 116 s. Bornova-İzmir.

Neu, C., Stein, N. and Keller, B., 2002, Genetic mapping of the *Lr20–Pm1* resistance locus reveals suppressed recombination on chromosome arm 7AL in hexaploid wheat, Genome 45: 737–744.

Obert, D. E., Fritz, A. K., Moran, J. L., Singh, S., Rudd, J. C. and Menz, M. A., 2005, Identification and molecular tagging of a gene from PI 289824 conferring resistance to leaf rust (*Puccinia triticina*) in wheat, Theor. Appl. Genet. 110:1439–1444.

Oerke, E. C., 1994, Estimated crop losses due to pathogens, animal pests and weeds. In: Oerke, E.C., Dehne, H.W., Schönbeck, F., Weber, A. (eds.), Crop Production and Crop Losses: Estimated Losses in Major Foods and Cash Crops, Elsevier, Amsterdam, pp. 72-88.

Onoğur, E., 1993, Bitki Fungal Hastaliklari (I) (Basidiomycotina), Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayinlari Ders Notlari No: 33, E.Ü.Ziraat Fak. Ofset Basimevi. Bornova-İzmir.

Park, R. F. and McIntosh, R. A., 1994, Adult Plant Resistances to *Puccinia Recondita* f. sp. *Tritici* in Wheat, New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 22: 151-158.

Paterson, A. H., 1996, Making Genetic Maps. In: A.H. Paterson (Ed.), Genome Mapping in Plants, pp. 23–39. R. G. Landes Company, San Diego, California; Academic Press, Austin, Texas.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Plaschke, J., Ganal, M. W. and Röder, M. S., 1995, Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers, Theor. Appl. Genet. 91:1001-1007.

Pretorius, Z. A., Wilcoxson, R. D., Long, D. L. and Schafer, J. F., 1984, Detecting wheat leaf rust resistance gene *Lr13* in seedling, Plant Dis. 68:585-586.

Prins, R., Marais, G. F., Janse, B. J. H., Pretorius, Z.A. and Marais, A.S., 1996, A physical map of the *Thinopyrum*-derived *Lr19* translocation, Genome 39:1013-1019.

Prins, R., Groenewald, J. Z., Marais, G. F., Snape, J. W. and Koebner, R. M. D., 2001, AFLP and STS tagging of *Lr19*, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat, Theor. Appl. Genet. 103:618–624.

Rafalski, J. A., Vogel, J. M., Morgante, M., Powell, W., Andre, C. and Tingey, S. V., 1996, Generating and Using DNA Markers in Plants. In: Nonmamalian Genomic Analysis: A Practical Guide. Academic Press. San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto, 75-134.

Rajaram, S., Singh, R. P. and Torres, E., 1988, Current CIMMYT approaches in breeding wheat for rust resistance. In: Simmonds NW and Rajaram S (eds) Breeding Strategies for Resistance to the Rusts of Wheat. CIMMYT, Mexico, D.F. pp 101-l 17.

Raupp, W. J., Singh, S., Brown-Guedira, G. L. and Gill, B. S., 2001, Cytogenetic and molecular mapping of the leaf rust resistance gene *Lr39* in wheat, Theor. Appl. Genet. 102:347–352.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Roelfs, A. P., Singh, R. P. and Sari, E. E., 1992, Rust diseases of wheat: Concepts and methods of diseases management, Mexico, D. F.: CIMMYT, 81 pages.

Röder, M. S., Korzun, V., Gill, B. S. and Ganal, M. W., 1998a, The physical mapping of microsatellites markers in wheat, Genome 41:278-283.

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

Salvi, S., 2006, Description of molecular marker types, Wuemed Traning Course, June 5-10, 2006, Bologna-Italy.

Samborski, D. J., 1985, Wheat leaf rust, In: Roelfs A. P., Bushnell W. R. (eds) The Cereal Rusts vol II: Diseases, Distribution, Epidemiology, and Control, Academic Press, Orlando, pp:39-59.

Samborski, D. J. and Dyck, P. L., 1982, Enhancement of resistance to *Puccinia recondita* by interactions of resistance genes in wheat, Can. J. Plant Path. 4: 152-156.

Seyfarth, R., Feuillet, C., Schachermayr, G., Winzeler, M. and Keller, B., 1999, Development of a molecular marker for the adult plant leaf rust resistance gene *Lr35* in wheat, Theor. Appl. Genet. 99:554–560.

Seyfarth, R., Feuillet, C., Schachermayr, G., Messmer, M., Winzeler, M. and Keller, B., 2000a, Molecular mapping of the adult-plant leaf rust resistance gene *Lr13* in Wheat (*Triticum aestivum* L.), J. Genet. & Breed. 54:193-198.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Seyfarth, R., 2000b, Development of Molecular Markers for the Adult Plant Leaf Rust Resistance Genes *Lr13* and *Lr35* in Wheat, PhD Thesis, Swiss Federal Institute of Technology, Zürich, 75p.

Shoaib, A. and Arabi, M. I. E., 2006, Genetic diversity among Syrian cultivated and landraces wheat revealed by AFLP markers, Genetic Resources and Crop Evolution 53:901–906.

Singh, D., Park, R. F. and McIntosh, R. A., 2001, Inheritance of seedling and adult plant resistance to leaf rust of selected Australian spring and English winter wheat varieties, Plant Breeding 120:503-507.

Singh, R. P. and Rajaram, S., 2002, Breeding for disease resistance in wheat, FAO Corporate Document Repository, http://www.fao.org.

Singh, S., Franks, C. D., Huang, L., Brown-Guedira, G. L., Marshall, D. S., Gill, B. S. and Fritz, A., 2004a, *Lr41, Lr39*, and a leaf rust resistance gene from *Aegilops cylindrica* may be allelic and are located on wheat chromosome 2DS, Theor. Appl. Genet. 108:586–591.

Singh, R., Datta, D., Priyamvada, Singh, S. and Tiwari, R., 2004b, Marker-assisted selection for leaf rust resistance genes *Lr19* and *Lr24* in wheat (*Triticum Aestivum* L.), J. Appl. Genet. 45(4):399-403.

Somers, D. J., Isaac, P. and Edwards, K., 2004, A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.), Theor. Appl. Genet. 109:1105–1114.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Stepien, L., Golka, L. and Chelkowski, J., 2003, Leaf rust resistance genes of wheat: Identification in cultivars and resistance sources, J. Appl. Genet. 44(2):139-149.

Tör, M., 1998, Bitkilerde moleküler konukçu-patojen ilişkilerindeki son gelişmeler, Tr. J. of Biology 22:271-285.

Vikal, Y., Chhuneja, P., Singh, R. and Dhaliwal, H. S., 2004, Tagging of an *Aegilops speltoides* derived leaf rust resistance gene *Lr* 28 with a microsatellite marker in wheat, J. Plant Biochemistry & Biotechnology 13:47-49.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Rijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M., 1995, AFLP: A new technique for DNA fingerprinting, Nucl. Acid Res. 23: 4407–4414.

William, M., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., Ortiz Islas, S. and Hoisington, D., 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.

Winzeler, M., Mesterházy, A., Park, R. F., Bartos, P., Csösz, M., Goyeau, H., Ittu, M., Jones, E., Löschenberger, F., Manninger, K., Pasquini, M., Richter, K., Rubıales, D., Schachermayr, G., Strzembıcka, A., Trottet, M., Unger, O., Vida, G. and Walther, U., 2000, Resistance of European winter wheat germplasm to leaf rust, Agronomie 20:783–792.

Wisniewska, H., Stepien, L. and Kowalczyk, K., 2003, Resistance of spring wheat cultivars and lines to leaf rust, J. Appl. Genet. 44(3): 361-368.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Xu, X.,Bai, G., Carver, B. F., Shaner, G. E. and Hunger, R. M., 2005, Molecular characterization of slow leaf-rusting resistance in wheat, Crop Sci. 45:758–765.

Zabeau, M. and Vos, P., 1993, Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting, European Patent Application Number:92402629.7, Publication Number 0 534 858 A1.

Zhong, S., Effertz, R. J., Jin, Y., Franckowiak, J. D. and Steffenson, B. J., 2003, Molecular mapping of the leaf rust resistance gene *Rph6* in barley and its linkage relationships with *Rph5* and *Rph7*, Phytopathology 93(5):604-609.

ÖZGEÇMİŞ

Fatma AYKUT 10.03.1977 tarihinde Antalya'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Antalya'da tamamladı. 1994-95 öğrenim yılında girdiği Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünden 1998'de mezun oldu.

1998-99 öğrenim yılında Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Bitki Islahı ve Genetiği Bilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı ve 2001 yılında aynı bölümde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladı. 2002 yılında yüksek lisansını tamamladı. 2003 yılında aynı bilim dalında doktora öğrenimine başladı. Halen aynı görevde bulunmaktadır.