



TÜRKİYE BİLİMSEL VE 2006-407
TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

**KUNDURU-1149 X CHAM-1 MELEZİNDEN
GELİŞTİRİLEN F6 POPULASYONUNDA SARI PAS
HASTALIĞINA DAYANIKLILIK RGA'LARIN
(DAYANIKLI GEN ANALOGLARI) BELİRLENMESİ
VE ISLAH PROGRAMLARINDA KULLANIMI:
MAKARNALIK BUĞDAYDA SARI PASA
DAYANIKLI GENLERİN TANIMLANMASI**

PROJE NO : TBAG-2357 (103T178)

Temel Bilimler Araştırma Grubu
Basic Sciences Research Grant Committee

90889

3

**KUNDURU-1149 X CHAM-1 MELEZİNDEN
GELİŞTİRİLEN F6 POPULASYONUNDA SARI PAS
HASTALIĞINA DAYANIKLILIK RGA'LARIN
(DAYANIKLI GEN ANALOGLARI) BELİRLENMESİ
VE ISLAH PROGRAMLARINDA KULLANIMI:
MAKARNALIK BUĞDAYDA SARI PASA
DAYANIKLI GENLERİN TANIMLANMASI**

PROJE NO : TBAG-2357 (103T178)

**PROF. DR. ZEKİ KAYA
DOÇ.DR. MÜGE SAYAR
HALE TUFAN
ELİF ÖZCAN
YRD. DOÇ. DR. BELGİN GÖÇMEN
AYTEN DİZKIRICI
DR. TANER AKAR**

**HAZİRAN 2006
ANKARA**

4
5
6
7
8
9
10
10
11
12
12
13
13
13
13
14
15
15
16
16
18
18
18
22
31

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	4
TABLO LİSTESİ	5
ŞEKİL LİSTESİ	6
ABSTRACT	7
ÖZET	8
1. Giriş	9
2. Genel Bilgiler	10
2.1. Türkiye’de Makarnalık Buğday	10
2.2. Sarı Pas Hastalığı	11
2.3. Hastalıklara Dayanıklılık Genleri	12
2.4. Moleküler Markör Yöntemleri	12
2.4.1. Mikrosatellitler (SSR)	13
2.4.2. NBS profillemesi	13
3. Yöntem	13
3.1. Makarnalık Buğday Populasyonu	13
3.2. DNA İzolasyonu	14
3.3. Hatların Fenotipik Değerlendirilmesi	15
3.4. NBS Profillemesi	15
3.5. SSR Analizi	16
3.6. Poliakrilamid Jel Analizi	18
4. Sonuçlar	18
4.1. SSR ve NBS Profillemesi Bantlarının Skorlanması	18
4.2. NBS Profillemesi Bantlarının Klonlanması ve Dizi Analizleri	22
6. Kaynaklar	31

ÖNSÖZ

Bu proje kapsamında, daha önce başlattığımız makarnalık buğdayda ekonomik ve agronomik bakımdan önemli olan karakterlerde QTL (kantitatif Karakter Lokuslar) haritalama çalışmalarına devam edilmiş olup, ülkemizde makarnalık buğday (*Triticum durum* Desf.) üretimini büyük ölçüde etkileyen en önemli hastalıklardan biri olan sarı pas hastalığına karşı dayanıklılık genlerinin karakterizasyonu yapılmıştır. Şimdiye kadar farklı patojenlere karşı dayanıklılık gösterdiği anlaşılan 20'den fazla dayanıklılık geni saptanmıştır. Bu genlerin kodladığı proteinlerde bulunan korunmuş NBS/LRR (nükleotit bağlanma bölgesi/leucine'ce zengin tekrarlar) motifler tespit edilerek bu motiflere özgü spesifik primerler kullanılmıştır. Daha önce oluşturulan Kunduru-1149 X Cham-1 melezinden geliştirilen 150 hatlık F₆ makarnalık buğday populasyonu, çevre koşullarından etkilenmeyen ve genlerin daha etkin seçilimine olanak veren PCR tabanlı dayanıklılık-gen-analog (Resistance-Gene Analogs (RGAs)) yaklaşımıyla incelenmiş, ayrıca NBS profillemeye tekniği ile gen analogları tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu proje ile makarnalık buğdayda sarı pasa dayanıklılık genlerinin kalıtımı ve özellikleri hakkında bilgimiz artmış olup, ekonomik bakımdan önemli olan diğer kantitatif özelliklerdeki agronomik karakterleri kodlayan genlerin sayısı ve etkileri çalışmalarına devam edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Projenin sonuçları bu konuda ileride çalışacak araştırmacalara yol gösterici olacaktır.

Projemiz, TÜBİTAK Temel Bilimler Araştırma Grubu tarafından desteklenmiştir. Proje desteği için TÜBİTAK- Temel Bilimler Araştırma Grubuna teşekkür ederiz. Ayrıca projeye Boğaziçi Üniversitesi (Araştırma Fonu Proje No:03B103), ile BSPP ve EMBO'da (ASTF 109-2004, Hale Tufan için araştırma bursu) mali olarak, Dr. Lesley Boyd'da (John Innes Research Center, England) laboratuvar olanakları olarak destekte bulunmuşlardır.

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. WYR 85-22 (6EOA+) sarı pas izolatu ile inoküle edilen 150 hattın kategorizasyonu.....	14
Tablo 2. Kullanılan primerlerin sekansları ve bağlanma sıcaklıkları.....	16
Tablo 3. Markörlerin genomdaki yerleri ve bağlanma sıcaklıkları	17
Tablo 4. Kullanılan mikrosatellit primerlerin sekansları.....	17
Tablo 5. Primerlerin PCR optimizasyonları ve bağlanma sıcaklıkları.....	18
Tablo 6. Olgun bitkilerde sarı pasa dayanıklılık için QTL (Kruskall-Wallis) analizi.....	20
Tablo 7. Genç bitkilerde sarı pasa dayanıklılık için QTL (Kruskall-Wallis) analizi	21
Tablo 8. T7-Sp6 PCR reaksiyonu koşulları.....	23
Tablo 9. PCR Döngüleri ve süreleri	23
Tablo 10.NBS3 290 ve NBS2 290 için homoloji sonuçları.....	27
Tablo 11. BS2 350 için homoloji sonuçları.....	27

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Sarı pas ile hastalandırılmış 14 günlük Kunduru-1149 X Cham-1 melezi bireylerin değerlendirilmesinin bir örneği	14
Şekil 2. 53 bireylik alt populasyonda NBS profiling yöntemini kullanarak çıkarılmış polimorfizim profili.....	22
Şekil 3. SSR primerleri ile alt populasyonda polimorfizim taraması.....	22
Şekil 4. Agaroz jelinde yürütülmüş T7-Sp6 PCR ürünleri.....	23
Şekil 5. SSCP jelinde izole edilen 60 adet klon DNA'sının görünümü.....	24
Şekil 6. Dizi analiz sonucu NBS2 290 için 12 plasmitten elde edilen DNA dizilerinin eşleştirmesi ve bunlarda ortak olan amino asit dizileri.....	25
Şekil 7. Fidan aşamasında sarı pasa dayanıklılık gösteren QTL'lerin konumu.	26

ABSTRACT

Turkey is one of the leading durum wheat producers in the Middle East and one of the most important biotic stress factors restricting the production is yellow rust. An F₆ recombinant inbred line durum wheat population consisting of 150 lines from a Kündürü-1149 x Cham-1 cross was previously characterized for field resistance by Göçmen et. al. (GÖÇMEN, 2003). They were tested for seedling resistance using a yellow rust isolate. Based on the categories formed in test, 53 of the 150 lines were chosen to constitute a sub-population. This sub-population were used to screen for simple sequence repeat (SSR) and Nucleotide binding site (NBS)-profiling markers. Linkage analysis with segregating markers formed three linkage groups. The SSR and NBS-profiling markers in linkage groups were evaluated with respect to yellow rust seedling and adult phenotypes (GÖÇMEN et al., 2003) using the Kruskal-Wallis single marker regression analysis program in MapQTL version 5 for Windows. Two QTLs were found on chromosome 1BL where the NBS-profiling band NBS3 290 was linked to other three SSR markers. Three of the NBS-profiling bands were excised and cloned into a pGEM-T Easy vector and sequenced. The obtained sequences were analyzed using the BLASTX program. These sequences show homology to known NBS-LRR resistance gene in plants. Due to this sequence homology and results of the linkage analysis, it is predicted the presence if two QTLs on chromosome arm 1BL.

Key Words: Durum wheat, Yellow rust, *Puccinia striiformis*, NBS profiling, SSR markers, QTL mapping.

ÖZET

Türkiye, Yakın ve Orta Doğu bölgelerinin en önemli durum buğdayı üreticilerindedir ve bu önemli üretimi etkileyen en önemli hastalıklardan birinin sarı pas olduğu kabul edilmektedir. Kunduru-1149 x Cham-1 melezlenmesi ile geliştirilmiş, 150 hatlık F₆ durum buğday populasyonunun yetiştirilen bitki sarı pas dayanıklılığı Göçmen ve ark. (GÖÇMEN, 2003) tarafından araştırılıp değişen dayanıklılıklara sahip oldukları bulunmuştur. Bu hatlar bir sarı pas izolatu kullanılarak fidan ve olgun evrelerde dayanıklılık açısından fenotipik olarak değerlendirilmiştir. Test sonucu oluşan kategorilere dayanarak, 150 hattın 53'ü bir alt olarak populasyon seçilmiş, ve bu populasyonlarda SSR (basit dizi tekrarları) ve NBS (nukleotid bağlanma bölgeleri)-profilleme teknikleri kullanılarak genetik belirteç (marker) çalışmalarında kullanılmıştır. Yapılan genetik bağlantı analizleri sonucu, üç bağlantı grubu belirlenmiştir. MapQTL programının "Kruskall-Wallis" ve "Interval Mapping" fonksiyonları kullanılarak fide ve yetiştirilen dönemlerinde görülen dayanıklılık ile bağlantı gruplarında bulunan genetik belirteçler arasındaki ilişkiler karakterize edilmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda 1BL kromozomunda NBS3 290 NBS-profilleme bantının yanısıra 3 SSR belirteçinde bulunduğu bağlantı grupta 2 QTL belirlenmiştir. 1BL kromozomunda QTL ile yüksek ilinti gösteren NBS3 290 bantı ve bu bölge dışında bulunan 2 diğer NBS-profilleme bantı "pGEM-T Easy" vektörü kullanılarak klonlanmış ve DNA dizin analizine tabi tutulmuştur. Elde edilen DNA dizileri BLASTX programı kullanılarak bilinen dizilerle karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak NBS-profilleme bantlarının tümünün bilinen NBS-LRR tipi dayanıklılık genlerine homoloji gösterdikleri görülmüştür. DNA dizin homolojisi ve bağlantı analizi sonucunda 1BL bölgesinde iki adet QTL bulunduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Durum buğdayı, sarı pas, *Puccinia striiformis*, NBS profilleme, SSR belirteçler, QTL haritalama.

1. Giriş

Türkiye, makarnalık buğday (*Triticum durum* Desf.) üretiminde üçüncü sırada olup, tarım alanlarının yaklaşık yarısı buğday ekimi için kullanılmaktadır. Bu üretimi etkileyen en önemli hastalıklardan biri sarı pas hastalığıdır. Son yıllarda düşen yıllık üretimin engellenmesi için sarı pasa dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi ve üretimde kullanılması zorunlu hale gelmiştir. Önceki çalışmalarda (GÖÇMEN, 2001, 2003), Kunduru-1149X Cham-1 melezinden geliştirilen 150 hatlık F₆ makarnalık buğday populasyonunun sarı pas hastalığına dayanıklılık açısından değişkenlik gösterdiği bulunmuştur. Çalışma sonucunda sarı pasa dayanıklılığın kalıtım değerlerinin çok yüksek olduğu, 150 hattın %86'sının ıslah programlarında kullanılabilecek düzeyde sarı pasa dayanıklılık gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Bu projede, bahsi geçen makarnalık buğday hatları kullanılarak sarı pas hastalığına dayanıklılık genlerin saptanması ve ıslah programlarına kazandırılması amaçlanmış olup, bu amacı gerçekleştirmek için, çevre koşullarından etkilenmeyen ve dayanıklılık genlerinin daha etkin seçilmesine olanak veren PCR-tabanlı dayanıklılık-gen analog (Resistance-Gene Analogs (RGAs)) yaklaşımı ile SSR genetik belirteç destekli ıslah yöntemi kullanılmıştır (GÖÇMEN ve ark. 2003).

Bugüne kadar toplam 20 adet değişik patojenlere karşı izole edilmiş hastalığa dayanıklılık genleri (R-genler) belirlenmiştir (RICHTER ve RONALD, 2000, PENUELA ve ark. 2002). Bu genlerin kodladıkları protein dizileri karşılaştırıldığında, şaşırtıcı derecede benzer korunmuş NBS/LRR motifler (nükleotit bağlanma bölgesi/"leucine"ce zengin tekrarlar) olduğu gözlenmiştir (SEAH ve ark. 1998, PAN ve ark. 2000).

Bu projenin amacı, bu korunmuş motiflere özgü primerler kullanılarak sarı pas hastalığının araştırılması ve dayanıklılığa bağlı markörlerin geliştirilmesidir. Proje kapsamında, dayanıklılık ıslah programlarının ileride daha etkin yapılabilmesi için gerekli bilimsel alt yapı verilerinin eldesi amaçlanmıştır.

2.Genel Bilgiler

2.1. Türkiye’de Makarnalık Buğday

Buğday, dünyada en yaygın üretilen tahıl olup, makarnalık buğdayı, toplam buğday üretimi yapılan alanın %8’ini oluşturmaktadır (SRIVASTAVA, 1984). Dünya genelinde Orta Doğu, Kuzey Afrika, Kuzey Amerika’nın geniş alanları, ve Akdeniz ülkelerinin yarı kurak bölgelerinde yetiştirilmektedir. Orta Doğu ve Kuzey Afrika dünya makarnalık buğdayı üretiminin %40’ından fazlasını gerçekleştirmektedir (GÖÇMEN, 2001).

Makarnalık buğday ülkemizde geleneksel olarak üretilmekte olup, 1930’ların başında toplam buğday üretim alanının %40-80’ini kapsarken, yüksek kaliteli ekmeklik buğday varyetelerinin ülkemize tanıtılması ile bu makarnalık ekmeklik buğday türleri lehine olmak üzere değişmiştir. Bunun sonucu olarak, makarnalık buğdayı üretimi kıyı bölgelerle sınırlı kalmak zorunda kalmıştır. Artan nüfusla beraber tüketim ihtiyacını karşılamak için geçtiğimiz yıllarda makarnalık buğdayı ithalatına mecbur kalınmıştır (GÖÇMEN, 2001).

Ülkemizde (1) İç Anadolu, (2) Güneydoğu Anadolu, ve (3) Ege, Marmara ve Akdeniz bölgelerinin kıyı kesimleri olmak üzere başlıca 3 bölgede üretimi yapılmakta olan makarnalık buğdayının üretimi, sayısı son derece az olan birkaç varyete ile sınırlıdır. Bunlar; Kunduru-1149, Çakmak-79, Kızıltan-91 ve Ç-1252 olarak sıralanabilir. Bu varyetelerin dezavantajları soğuğa ve başta pas olmak üzere çeşitli hastalıklara karşı hassas olmaları ve düşük tane kalitesidir (GÖÇMEN, 2001).

Ülkemizde makarnalık buğdayın üretimini sınırlayan belli başlı etkenler; fiyat politikası, biyotik ve abiyotik etkenler olarak sıralanabilir. Makarnalık buğday fiyatının ekmeklik buğday ile rekabette yetersiz kalması sebebiyle çiftçiler üretimden vazgeçmektedir. Soğuk ve kuraklık abiyotik etkenler arasında en önemlileri olup, bitkiye zarar vererek tane kalitesinin ve sayısının düşmesine neden olmaktadır. Bunların dışında, pas, küf, septorya, külleme, çeşitli virüsler, bazı kök hastalıkları da üretimi önemli ölçüde etkilemektedir (GÖÇMEN, 2001).

2.2. Sarı Pas Hastalığı

Pas hastalıkları, biyotik faktörler içinde ülkemizdeki buğday üretimini etkileyen en önemli etken olarak görülmektedir. Ülkemizde görülen belli başlı üç pas hastalığı gözlemlenmektedir; sarı pas, kahverengi pas ve kara pas. Bunlar arasında en önemlisi sarı pas hastalığıdır. Hastalığın etkeni, *Puccinia striiformis* isimli mantar patojendir. Buğday, arpa ve çavdar üzerinde etkilidir. Kökeninin Ermenistan ve Azerbeycan olduğu düşünülmekte olup, Avrupa, Çin ve Doğu Asya'ya yayılmıştır (LINE, 2002).

Hastalık, buğday tarlalarında ilkbaharda hava sıcaklığının 10-15°C (optimum: 11 °C) olduğu zaman görülmeye başlar. Yaprakların üst yüzeylerinde makina dikişine benzer şekilde püstüller oluşur. Bu püstüllerin dizilişi bir çizgiyi andırdığı için bu pasa çizgi pası da denilir. Sıra veya sıralar üzerine dizilmiş noktacıklar biçiminde olan bu püstüllerin içinde etmenin yazlık sporları meydana gelir. Bu püstüller limon veya portakal rengindedir. İlkbaharda bu püstüllerden oluşan milyonlarca yazlık spor rüzgarla çevreye dağılır. Uygun koşullarda taşındığı buğday bitkilerini enfekte ederek yeni püstüller oluştururlar. Enfeksiyonların oluşumunda sıcaklık ve nem çok önemlidir. Üredosporların çimlenip konukçuya giriş yapabilmesi için % 100'e yakın orantılı neme veya yağışa gereksinimi vardır (ROELFS ve ark., 1992; SINGH ve ark., 2002).

Türkiye'de enfeksiyon yapan ırklar hakkında bilgi sınırlı olmasına rağmen, 1970 ile 1991 yılları arasında 2E16, 70E16, 6E16, 46E13, 46E15, 14E16, 70E0, 6E0, 86E16, 2E0, 2E16, 6E16 ve 6E150 ırklarının faaliyeti gözlenmiştir (GÖÇMEN, 2001).

Sarı pasın serin ve nemli iklim koşullarını tercih etmesinden ötürü Orta ve Doğu Anadolu Bölgesi hastalığa karşı daha hassas ve savunmasızdır. Hastalığın ülkemizde ilk defa görülmesi 1886 yılına kadar uzanır. Ülke çapında önem arzeden salgınlar sırasıyla 1936, 1940, 1950 ve 1963 yıllarında görülürken, yerel ve bölgesel önem taşıyan salgınlara ise 1975, 1976, 1977, 1984 ve 1991'de rastlanmıştır. 1963 yılında %35'lere varan ürün kaybı, 1969-1980 yılları arasında %20-80 olarak kaydedilmiştir (GÖÇMEN, 2001).

Bugüne kadar, ülkemizde sarı pasa karşı fungusit kullanımı pek çok kereler denenmiş olup, başarı elde edilmiş olmasına karşın fungusitlerin pahalı olması nedeniyle süreklilik sağlanamamıştır (BRADSLEY ve THOMAS, 2005, GÖÇMEN, 2001). Ülkemizdeki ürün kayıpları, seçilen tek bir çeşitin geniş alanlara ekilmesinden kaynaklanmakta, bu çeşitin dayanıklılığının çökmesi halinde büyük toplu kayıplar meydana gelmektedir. Bradsley ve Thomas'ın çalışmasına göre (BRADSLEY ve THOMAS, 2005), ülkemizde ekilen tüm buğday çeşitleri sadece tek bir dayanıklılık genine dayanmakta, mantarda görülen mutasyonlar sonucu virülens genleri değiştiğinde büyük kayıplar yaşanmaktadır. Örnek olarak Gerek79, 2 milyon hektar ekim alanıyla ülkemizde en yaygın ekilen buğday çeşidi olup, 1990'dan beri sarı pasa karşı çok hassas olduğu bilinmektedir.

2.3. Hastalıklara Dayanıklılık Genleri

Dayanıklılık genleri kullanılarak sağlanan iyileştirme çalışmalarındaki temel avantaj; bitkiye en az zarar vererek tamamen dayanıklılığın sağlanması ve pestisit kullanımının ortadan kalkması olarak ifade edilebilir.

Bugüne kadar bitkilerde yaklaşık 20 adet değişik hastalığa dayanıklılık geni (R) belirlenmiş olup bu genlerin kodladıkları protein dizileri karşılaştırıldığında, şaşırtıcı derecede benzer korunmuş NBS/LRR motifler (nükleotit bağlanma bölgesi / "leucine"ce zengin tekrarlar) olduğu gözlenmiştir. Bu motifler dikkate alınarak geliştirilen primerlerle yapılan çalışmalarda çeşitli hastalıklara dayanıklılık genleri tespit edilebilmiştir. Çeşitli buğday türlerinde şimdiye kadar 50'den fazla gen bulunmuş olup, bunların hangi kromozomlarda yer aldığı tespit edilmiştir (BOYD, 2005). Dayanıklılık özelliği veren gen analoglarının (RGA) tespit edilmesinde moleküler markörler sıklıkla kullanılmaktadır.

2.4. Moleküler Markör Yöntemleri

Bu projede iki tür moleküler belirteç yöntemi kullanılmıştır. Bunlar mikrosatellitler ve resistant gen analog bazlı NBS profillemeye sistemleridir.

2.4.1. Mikrosatellitler (SSR)

Mikrosatellitler, genom içinde dağılmış, tekrar eden kısa DNA baz segmentleri olup, daha çok kodlanmayan DNA bölgelerinde bulunurlar. Mikrosatellit genetik belirteçler, bu tekrarlardaki değişimleri tespit etmek için kullanılır. Bu tekrar sayılarındaki yüksek polimorfizm ve rekombinasyonlar, mikrosatellitleri genetik belirteçler içinde önemli kılmaktadır. Mikrosatellitler günümüzde, QTL (kantitatif özellik lokus) haritalanması, MAS (markör yardımıyla seçim), kalitatif gen etiketlenmesi gibi birçok yöntemde yaygın olarak kullanılmaktadır (CAMPBELL ve ark., 2003; BUDAK ve ark., 2004)

2.4.2. NBS profileme

Bu yöntemde ise, genomdaki korunmuş NBS/LRR motifleri içindeki polimorfizmi bulmaya yaramaktadır. Yöntem PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) tabanlı olup, dayanıklılık (R) genlerini ve bu genlerin analoglarını (RGA) hedef almaktadır.

Yöntemde, genom DNA'sı restriksiyon enzimiyle kesilip ve kesili her bir uca adaptörler bağlanmaktadır. NBS/LRR motifine spesifik bir primer yardımıyla bu kısım çoğaltılarak ürünler sekanslama jelinde ayrılıp ve polimorfizm gözlemlenmektedir.

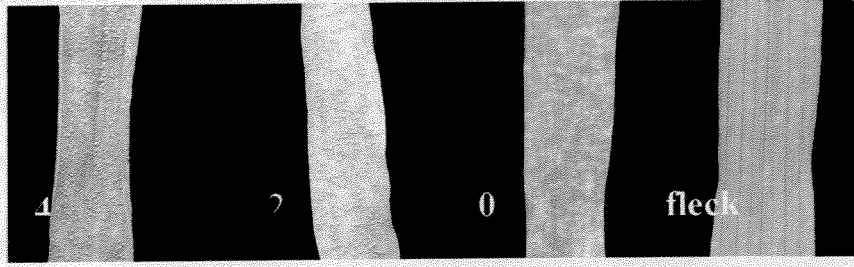
3. Yöntem

3.1. Makarnalık Buğday Populasyonu

Kunduru-1149 populasyonu hastalığa çok hassas olup, Cham-1 populasyonu ise dayanıklılık göstermektedir. Bu iki çeşidin çaprazlanması sonucunda 150 hatlık bir F₆ rekombinant populasyonu oluşturulmuştur.

B. Göçmen ve ark. (2003) tarafından geliştirilen ve 150 hattan oluşan bu F₆ populasyonunun fide düzeyinde direncinin ölçülmesi amacı ile her hattın 8 adet tohum içinde ıslak filtre kağıdı olan petri kaplarına yerleştirilip 25°C de 2-3 gün filizlenene kadar bekletilmiştir. Filizlenen tohumlar toprağa transfer edilip 14 günlük olana kadar büyütülmüştür. 14 günlük filizler, *Yr2*, *Yr6*, *Yr7* ve *Yr9* içeren WYR 85-22 (6EOA+) sarı pas izolatu ile 10°C de 24 saat inoküle edildikten sonra

seraya aktarılarak 14 gün boyunca hastalığın gözlenebilmesi için sera koşullarında büyütülmüştür. 14 gün sonunda bireylerin sarı pasa olan dayaklılıkları verilen skorlarla belirlenmiştir (Şekil 1). Fide düzeyindeki dayanıklılığa göre 150 hat 4 kategoriye ayrıldı (Tablo 1). Sarı pas inokülasyonuna verdiği cevaba göre kategorize edilen 150 hattın, toplam 53 fide seçilerek bir alt populasyon oluşturulmuştur (Tablo 1) (TUFAN, 2006).



Şekil 1. Sarı pas ile hastalandırılmış 14 günlük Kunduru-1149 X Cham-1 melezi bireylerin değerlendirilmesinin bir örneği. Soldan sağa; 4:hassas, 2:orta dayanıklı, 0:dayanıklı, fleck:hiper dayanıklı (Tufan, 2006)

Tablo 1. WYR 85-22 (6EOA+) sarı pas izolatu ile inoküle edilen 150 hattın kategorizasyonu.

Kategori	Fide fenotipi	Seçilen birey sayısı
I	Orta düzeyde dayanıklı	12
II	Dayanıklı	12
III	Hiper dayanıklı	23
IV	Hassas	6

3.2. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için çimlendirilen buğday fidelerinin yaprak kısımları kullanılmış olup kullanılan yöntem şöyledir (KAYA ve NEALE, 1995): her bir buğday fidesine ait 0.1 gram taze yaprak otoklavlanarak steril edilmiş havanlara konularak üzerine mekanik parçalanmayı kolaylaştırıcı steril kum ve 400 µl özütlemeye tamponu ilave edilmiştir. Oluşan karışım homojen yeşil bir görünüm alana kadar havanda ezilmiştir. Karışım 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine konularak üzerine tekrar 300 µl özütlemeye tamponu ve 50 µl β-merkapt etanol eklenmiştir. Eppendorf tüpleri önceden 65 °C'ye ısıtılmış su banyosunda 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra tüplere 500 µl 1:1 olarak hazırlanmış kloroform:izoamil alkol ilave edilerek karıştırılmış ve 15

dakika süresince 13000 rpm hızla +4 °C’de santrifuj edilmiştir. Tüplerin üst kısmında bulunan sıvı kısım temiz tüplere aktarılarak üzerine 500 µl soğuk izopropanol eklenmiştir. Ardından – 80 °C’de en az 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra tüpler 10 dakika süresince +4 °C’de 13000 rpm hızla santrifuj edilmiştir. Santrifuj sonrasında üst kısımda bulunan sıvı tabaka dökülerek DNA çökeltisi 400 µl soğuk etil alkol ile (%70 ‘lik) 2 kez yıkanmıştır. Daha sonra etil alkol uçurularak DNA kurutulmuş ve 50 µl TE tamponunda (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0) çözülmüştür. Elde edilen DNA örnekleri -80°C’de saklanmıştır. Daha sonra elde edilen DNA miktarları florometrik yöntemle belirlenerek 10 ng/µl’ye seyreltilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri - 80°C’de, seyreltilmiş DNA örnekleri ise –20°C’de saklanmaktadır.

3.3. Hatların Fenotipik Değerlendirilmesi

Daha önce Göçmen (GÖÇMEN, 2001) tarafından yapılan çalışmada her bir hat için 25 tohum seçilerek 3’er tekrarlı olarak ekilmiş ve *Puccinia striiformis*’ in *Yr2*, *Yr6*, *Yr7* ve *Yr9* virülens genlerini taşıyan sporları püskürtme yöntemiyle ergin bitkilere uygulanmıştır. Daha sonra, 150 hatlık populasyon reaksiyon yoğunluğu dikkate alınarak değerlendirilmiş ve buna göre hatlar şu şekilde kodlanmıştır: R (çok dayanıklı), MR (orta derecede dayanıklı), MS (orta derecede hassas), S (çok hassas).

Reaksiyon yoğunlukları dikkate alınarak yapılan istatistiki analizler neticesinde dayanıklılık karakterinin kalıtımının oldukça yüksek olduğu (0.92 ± 0.11) bulunmuştur.

3.4. NBS Profillemesi

Projemizde NBS profillemesi tekniği (VAN DER LINDEN et.al., 2004) modifiye edilerek kullanılmıştır. Genomik DNA *MseI* restriksiyon enzimi ile kesilerek her iki ucuna adaptörler bağlanmıştır. Adaptörlerin hazırlanması şu şekildedir: 1.25 nmol üst zincir ile 1.25 nmol alt zincir karıştırılarak sterildistile su ilave edilmiş ve 0.125 µM’lık karışım elde edilmiştir. Karışım daha önceden 95°C’ye ayarlanmış olan su banyosunda 3 saat süreyle bekletildikten sonra aşamalı şekilde oda ısısına gelmesi beklenmiştir.

Üst zincir 5'-ACTCGATTCTCAACCCGAAAGTATAGATCCCA-3'

Alt zincir

NH₂-3'- TTCATATCTAGGGTAT-5' P

Kesme/birleştirme reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan NBS spesifik DNA parçaları 2 aşamadan oluşan bir prosedür ile çoğaltılmıştır. İlk polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR); distile su, 1x PCR tampon çözeltisi, 0.2mM dNTP, 20nmol spesifik primerler (NBS2,NBS3 ya da NBS5), 20 nmol adaptör primerleri ve 0.4 ünitelik Taq polimeraz enzimi kullanılmıştır. Reaksiyon koşulları ; 95 °C'de 15 dakika, 30 döngü olarak 95°C'de 30sn, primer bağlanma sıcaklığında 1 dakika 40 saniye, 72°C'de 2 dakika, en son olarak 72°C'de 20 dakika olarak uygulanmıştır. Kullanılan primerlere ilişkin annealing sıcaklıkları tabloda verilmiştir (Tablo2):

Tablo 2. Kullanılan primerlerin sekansları ve bağlanma sıcaklıkları

Primer adı	Sekans	Primer bağlanma sıcaklığı
NBS2	5'-GTWGYTTICCYRAICCISSCAT-3'	60 °C
NBS3	5'-GTWGYTTICCYRAICCISSCATICC-3'	60 °C
NBS5	5'-YYTKRTHGTMITKGATGAYGTTTGG-3'	55 °C

Ondört mikrolitrelik birinci PCR ürünü %1'lik agaroz jelde yürütülmüş ve silik bir bant verdiği gözlenmiştir, yapılan ikinci PCR'da ise; distile su, 1x PCR tampon çözeltisi, 0.2mM dNTP, 2 nmol adaptör primeri, 5nmol spesifik primerler (NBS2,NBS3 ya da NBS5), 0.4 ünitelik Taq polimeraz enzimi ve 5 µl 10x PCR ürünü kullanılmıştır. Reaksiyon koşulları ; 95 °C'de 15 dakika, 30 döngü olarak 95°C'de 30sn, 55°C'de 1 dakika 40 saniye, 72°C'de 2 dakika, en son olarak 72°C'de 20 dakika olarak uygulanmıştır. Reaksiyon ürünü poliakrilamid jelde yürütülmüştür.

3.5. SSR Analizi

Daha önce alt populasyon oluşturmak için seçilen 53 hat ve ebeveyn hatlar 33 farklı SSR genetik belirteçleri ile taranmıştır. Kullanılan markörlerin listesi, genomdaki yerleri ve primer bağlanma dereceleri tablodan görülebilir (Tablo 3):

Tablo 3. Genetik belirteçlerin genomdaki yerleri ve bağlanma sıcaklıkları

Genetik belirteç	Lokasyon	Bağ. Sıc.	Genetik belirteç	Lokasyon	Bağ. Sıc.	Genetik belirteç	Lokasyon	Bağ. Sıc.
BARC148	1 AS	52°C	GWM148	2 BS	60°C	BARC151	5 AL	55°C
WMC312	1 AL	61°C	GMW526	2 BL	55°C	GWM443	5 BS	55°C
BARC61	1 BS	52°C	GWM369	3 AS	60°C	GWM499	5 BL	60°C
GWM153	1 BL	60°C	GWM391	3 AL	55°C	GWM459	6 AS	55°C
GWM268	1 BL	55°C	GWM376	3 BS	60°C	GWM169	6 AL	60°C
GWM140	1 BL	55°C	GWM181	3 BL	50°C	GWM132	6 BS	60°C
WMC156	1 BL	51°C	BARC106	4 AS	50°C	WMC182	6 BL	51°C
BARC188	1 BL	58°C	WMC262	4 AL	61°C	WMC83	7 AS	61°C
BARC181	1 BL	58°C	GWM368	4 BS	60°C	WMC525	7 AL	61°C
WMC177	2 AS	61°C	WMC47	4 BL	61°C	GWM297	7 BS	55°C
WMC181	2 AL	61°C	BARC180	5 AS	52°C	GWM333	7 BL	55°C

PCR (polimeraz zincir tepkimesi) için yaklaşık 240ng genomik DNA, 1X PCR tampon çözeltisi, 0.13 mM dNTP, 0.2 µM ön primer, 0.2 µM arka primer, ve 0.35 ünitelik *Taq* polimeraz enzimi kullanılmıştır. Reaksiyon koşulları; 94°C'de 3 dakika, 35 döngüde 94°C'de 1 dakika, primer bağlanma sıcaklığında 1 dakika, 72°C'de 2 dakika ve en son olarak uzama aşamasında 72°C'de 4 dakika olarak kullanılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri, poliakrilamid jelde yürütülmüştür.

Bu primerlere ek olarak çeşitli makalelerden seçilen 4 adet mikrosatellit primerin PCR optimizasyonu tamamlanarak tüm hatlar taranmıştır. Bu primerlere ait bilgiler Tablo 4'te görülebilir.

Tablo 4. Kullanılan mikrosatellit primerlerin sekansları

Primer	Forward	Reverse
Gwm95	GAT CAA ACA CAC ACC CCT CC	AAT GCA AAG TGA AAA ACC CG
Wmc522	AAA AAT CTC ACG AGT CGG GC	CCC GAG CAG GAG CTA CAA AT
Wmc170	ACA TCC ACG TTT ATG TTG TTG C	TTG GTT GCT CAA CGT TTA CTT C
Gwm273-1B	ATT GGA CGG ACA GAT GCT TT	AGC AGT GAG GAA GGG GAT C

Bu primerlerin optimizasyon koşulları ve bağlanma sıcaklıkları Tablo5'te belirtilmiştir.

Tablo 5. Primerlerin PCR optimizasyonları ve bağlanma sıcaklıkları

Toplam: 25 µl	Bağlanma sıcaklığı	su	dNTP (5 µM)	10X tampon	Primer (10µM)	MgCl (25mM)	Taq (5u/µM)	DNA
Wmc522	61 °C	12,5 µl	2 µl	2 µl	2+2 µl	2,5 µl	0,25 µl	2 µl
Wmc170	61 °C	10 µl	2 µl	2,5 µl	3+3 µl	2,5 µl	0,25 µl	2 µl
Gwm273-1B	55 °C	13,75 µl	2 µl	2 µl	1,5+1,5 µl	2 µl	0,25 µl	2 µl
Gwm95	60 °C	12,5 µl	2 µl	2 µl	2+2 µl	2 µl	0,25 µl	2 µl

3.6. Poliakrilamit Jel Analizi

Poliakrilamit jel yüzdesi olarak %4.75 kullanılmıştır. Jel karışımının içeriği; 480 g/L üre (Duchefa), 1x TBE (Severn Biotech), ve %5 19:1 akrilamit/bisakrilamit çözeltisidir (%40 stok çözeltisi, Severn Biotech). Karışım hazırlandıktan sonra 0.22 mikronluk membrandan (Millipore) geçirilerek 4°C'de muhafaza edilmiştir. Polimerizasyonu başlatmak için %0.05 (w/v) Amonyum Persülfat (Sigma) ve %0.05 (v/v) Temed (Pharmacia) eklenmiştir. Hazırlanan jel karışımı daha önceden hazırlanmış olan camların arasına dökülerek polimerizasyonun sağlanması için 1,5 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Formamid yükleme boyası ile karıştırılan PCR ürünleri 80 watt'ta 1,5-2 saat süreyle yürütülmüştür. Yürütme sonunda jel, gümüş nitrat ile boyanarak DNA bantları incelenmiştir.

4. Sonuçlar

4.1. SSR ve NBS Profilleme Bantlarının Skorlanması

SSR bantları için polimorfizm, her bir ebeveynde görülen bantlardaki kayma olarak ifade edilmiştir. SSR genetik belirteçleri genellikle kodominant olduklarından, homozigot bireyler ebeveynlerden birinin bandına sahipken, heterozigot bireyler ise iki ebeveynin de bandına sahiptir.

NBS profilleme bantları ise dominant özelliktedir. Yani, analiz edilen bireyler ya ebeveynlerden birinin bandına sahiptir, ya da hiç bant görülmez. SSR ve NBS-profillemeye bantları yukarıda anlatılan şekilde değerlendirildikten sonra JoinMap (version 5.0 for Windows) programına skorlar girilerek bağlantı grupları belirlenmiştir. Bu belirleme sırasında minimum LOD skoru 3.0,

maksimum rekombinasyon frekansı da (REC) 0.45 olarak belirlenmiştir. Rekombinasyon değerleri Kosambi haritalama özelliği ile genetik uzaklık cinsinden ifade edilmiştir.

Analiz sonucunda 3 adet bağlantı grubu bulunmuştur. Elde edilen bu gruplar fenotipik datalarla birlikte QTL (kantitatif özellik lokusu) haritalama programı olan MapQTL (version 5.0 for Windows) programı yardımıyla analiz edilmiştir.

Alt populasyonun bireylerinin SSR markörleriyle verdikleri profil hangi ebeveynin alelini taşıdıklarına göre değerlendirilmiştir (Şekil 2). Elde edilen değerler MapQTL 5 (Kyazma) bilgisayar programına B. Göçmen ve ark. tarafından yayınlanmış makaledeki (2003) yetişkin birey sarı pas dayanıklılık skorları ve tarafımdan yapılan fide düzeyindeki sarı pas dayanıklılık değerleri ile yüklenmiştir. Yetişkin birey fenotipleri için, 1BL kromozomunda bulunan gwm153 SSR markörü sarı pas dayanıklılığına $P<0.005$ düzeyinde, 6AL kromozomunda bulunan gwm169 SSR markörü ise $P<0.05$ düzeyinde bağlantı göstermektedir (Tablo 6). Ayrıca fide düzeyindeki fenotipler için, gwm153 markörü $P<0.005$, 1BS kromozomunda bulunan barc61 SSR markörü $P<0.05$ ve 7AS kromozomunda bulunan wmc83 SSR markörü $P<0.1$ düzeyinde sarı pas dayanıklılığına bağlantı göstermektedir (Tablo 7).

NBS profiling ile alt populasyon tarandığında toplamda 14 polimorfik bant bulunmuştur. Sonuçların değerlendirmesi bantların hatlarda varlığı ya da yokluğuna göre yapılmıştır (Şekil 3). Bu değerlendirme MapQTL 5 (Kyazma) bilgisayar programına B. Göçmen ve ark. tarafından yayınlanmış makaledeki yetişkin birey sarı pas dayanıklılık skorları ve bu projede yapılan fide düzeyindeki sarı pas dayanıklılık değerleri ile yüklenmiştir. Yetişkin birey fenotipleri için 6 bant $P<0.05$ ve 2 bant $P<0.1$ düzeyinde sarı pas dayanıklılığına bağlantı göstermektedir. Fide fenotipleri için 1 bant $P<0.01$, 4 bant $P<0.05$ ve 3 bant $P<0.1$ düzeyinde sarı pas dayanıklılığına bağlantı göstermektedir.

Tablo 6. Olgun bitkilerde sarı pasa dayanıklılık için QTL (Kruskall-Wallis) analizi. Group: Genetik bağlantı grubu, Location: Bağlantı grubundaki genetik belirteçin cM olarak konumu, Locus: Genetik belirteçler ve Significance: belirteç ile pasa dayanıklılık arasındaki ilişkinin istatistik bakımından önem derecesi'ni ifade etmektedir.

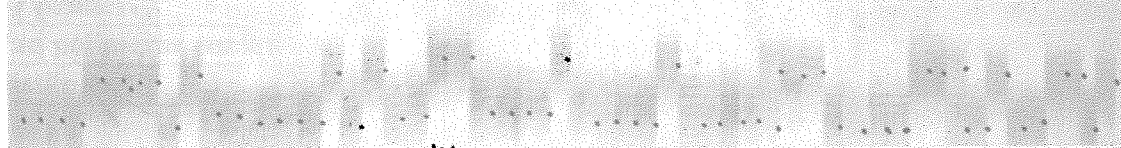
Group	location	Locus	K*	Significance
1	0	NBS2350bp	2,464	-
1	2,217	NBS2750bp	2,67	-
1	5,819	NBS3350bp	2,818	*
1	10,315	NBS3800bp	3,04	*
2	0	barc188	2,87	*
2	2,617	gwm268	5,937	**
2	5,03	gwm153	9,669	****
2	19,714	NBS3290bp	6,564	**
3	0	gwm297	0,025	-
3	5,202	gwm833	0,097	-
3	5,202	NBS2290bp	0,097	-
U	1	gwm140	0,173	-
U	2	wmc156	10,119	****
U	3	barc181	8,909	****
U	4	barc148	0,563	-
U	5	wmc312	2,683	-
U	6	barc61	0,373	-
U	7	wmc177	1,499	-
U	8	wmc181	1,046	-
U	9	gwm148	0,05	-
U	10	gwm626	0,843	-
U	11	gwm691	1,113	-
U	12	gwm676	0	-
U	13	gwm181	0,628	-
U	14	barc106	0,785	-
U	15	gwm668	0,47	-
U	16	wmc47	1,215	-
U	17	barc180	0,028	-
U	18	barc151	0	-
U	19	gwm443	0	-
U	20	gwm499	1,972	-
U	21	gwm459	0,084	-
U	22	gwm169	3,155	*
U	23	gwm132	1,623	-
U	24	wmc182	0,02	-
U	25	wmc83	0,254	-
U	26	wmc525	0,022	-
U	27	NBS2325bp	2,045	-
U	28	NBS21010bp	5,553	**
U	29	NBS3500bp	1,673	-

Tablo 7. Genç bitkilerde sarı pasa dayanıklılık için QTL (Kruskal-Wallis) analizi. Group: Genetik bağlantı grubu, Location: Bağlantı grubundaki genetik belirteçin cM olarak konumu, Locus: Genetik belirteçler ve Signif.: belirteç ile pasa dayanıklılık arasındaki ilişkinin istatistik bakımından önem derecesi'ni ifade etmektedir.

Group	Position	Locus	K*	Signif.
1	0	NBS2350bp	5.558	**
1	2.217	NBS2750bp	2.968	*
1	5.819	NBS3350bp	3.65	*
1	10.315	NBS3800bp	5.327	**
2	0	barc188	5.634	**
2	2.617	gwm268	7.133	****
2	5.03	gwm153	8.385	*****
2	19.714	NBS3290bp	6.428	**
3	0	gwm297	0.03	-
3	5.202	gwm333	0.289	-
3	5.202	NBS2290bp	0.289	-
U	1	gwm140	0.226	-
U	2	wmc156	13.275	*****
U	3	barc181	11.452	*****
U	4	barc148	1.737	-
U	5	wmc312	2.763	*
U	6	barc61	4.625	**
U	7	wmc177	0.078	-
U	8	wmc181	4.891	**
U	9	gwm148	0.178	-
U	10	gwm526	1.24	-
U	11	gwm391	0.181	-
U	12	gwm376	0.424	-
U	13	gwm181	1.462	-
U	14	barc106	0.359	-
U	15	gwm368	3.215	*
U	16	wmc47	0.907	-
U	17	barc180	0.048	-
U	18	barc151	0.005	-
U	19	gwm443	0.306	-
U	20	gwm499	1.314	-
U	21	gwm459	0.037	-
U	22	gwm169	0.49	-
U	23	gwm132	0.069	-
U	24	wmc182	0.017	-
U	25	wmc83	1.919	-
U	26	wmc525	0.528	-
U	27	NBS2325bp	2.183	-
U	28	NBS21010bp	4.654	**
U	29	NBS3500bp	1.95	-



Şekil 2. 53 bireylik alt populasyonda NBS profiling yöntemini kullanarak çıkarılmış polimorfizm profili. En sağdaki 2 birey ebeveynlerin profili olup, ok ile gösterilen bantlar klonlama için izole edilmiştir.



Şekil 3. SSR primerleri ile alt populasyonda polimorfizm taraması. En sağdaki 2 birey ebeveynlerin profilini göstermektedir.

İki markör tipide kullanılarak (SSR ve NBS profiling) genetik bağlantı JoinMap 3.0 (Kyazma) bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gwm153 SSR markörü, 290 baz büyüklüğündeki 2 ayrı NBS-profiling markörüne bağlantı göstermiştir (LOD: 3.04). Elde edilen sonuç, 1BL kromozomu üzerinde bir RGA'in varlığının göstergesi olabilir.

4.2. NBS Profillemeye Bantlarının Klonlanması ve Dizi Analizleri

NBS-profillemeye tekniğini kullanılarak bulunan ve sarı pas hastalığına karşı dirence bağlantı gösteren 4 bant akrilamit jelinden kesildi. Bu bantlardan ikisi Promega PGem-TEasy vektörünü kullanarak klonlandı. PGem-TEasy klonlama sistemini protokolüne göre LB-Amp kültür kaplarından beyaz renkli koloniler positif klon taşıyan koloniler olarak kabul edilmiştir. Bu beyaz kolonilerden klonlanan bant başına 60 adet klon seçildi. 60 adet klon sıvı LB kültüründe çoğaltılıp Promega Wizard Plus SV Minipreps sistemini kullanarak plasmid izolasyonu gerçekleştirildi.

Elde edilen plazmid izolasyonlarından klonlanan bantı çıkarmak için PGem-TEasy protokolüne uygun olarak T7-Sp6 primerlerini kullanarak PCR gerçekleştirildi. T7-Sp6 PCR koşulları Tablo 8 ve Tablo 9'de gösterilmiştir.

Tablo 8. T7-Sp6 PCR reaksiyonu koşulları

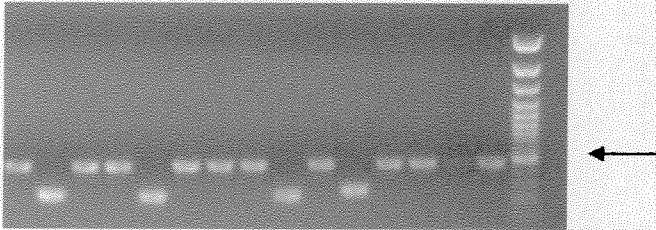
Madde	Konsantrasyon	Miktar	Reaksiyondaki konsantrasyon
Plazmid izolasyonu	73 ng/μl	0.3 μl	21.9 ng
MgCl₂	25 mM	1.2 μl	2 mM
10 X tampon çöz.	10 X	1.5 μl	1 X
dNTP	2 mM	1.5 μl	0.2 mM
Sp6 primeri	10 μM	0.4 μl	0.26 μM
T7 primeri	10 μM	0.4 μl	0.26 μM
Taq polimeraz enzimi	5 U/μl	0.1 μl	0.5 U
Distile su	-	9.6 μl	-

Tablo 9. PCR Döngüleri ve süreleri

Derece	Süre
95 °C	4:00 min
95 °C	0:30 min
50 °C	0:30 min
72 °C	0:30 min
72 °C	5:00 min

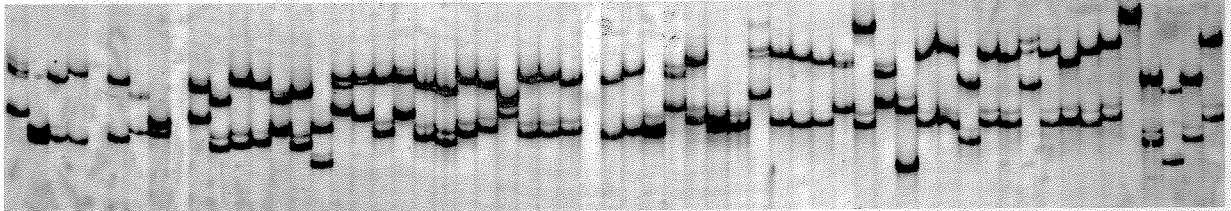
←
35 döngü
←

PCR ürünleri boş plazmidleri dolulardan ayırmak amacıyla %1 agaroz jelinde yürütülüp boyları kontrol edilmiştir (Şekil 4)



Şekil 4. Agaroz jelinde yürütülmüş T7-Sp6 PCR ürünleri. Daha düşük moleküler ağırlığa sahip olan ürünler bantı taşımayan klonlar olup sonraki aşamalarda kullanılmamıştır. Ok hizasında yürümüş olan bantlar bantı taşıdığı kabul edilen klonlar olup yaklaşık 467 kb uzunluğundadır.

60 plasmid izolasyonundan 467 kb uzunluğunda olan klonların istenilen bandı taşıyıp taşımadığını anlamak amacıyla SSCP tekniği kullanılmıştır. SSCP yöntemi ile DNA parçaları arasındaki sekans farklılıkları tek bazlık da olsa görülebilmektedir. Akrlamit jelinden kesilen banttardan elde edilen DNA da çoğunlukla sarı pas direncine bağlantı gösteren bandın DNA sı olduğu varsayıldığında; SSCP jellerinde çoğunlukta olan klon tipinin istenilen bant olduğu kabul edilebilir. Çoğunlukta olan klon tipini belirlenmesi için DNA parçası taşıyan PCR ürünleri SSCP jel yöntemiyle birbirlerinden ayırt edilmiştir (Şekil 4). SSCP jelleri: %12.5 19:1 Akrlamit/BisAkrlamit karışımı, 1 X TTE tamponu, % 10 glycerol, %0.1 APS ve TEMED karışımından hazırlanmıştır. SSCP jellerine her PCR ürününden 3.5 µl alınarak 3.5 µl formamid boyasıyla karıştırılıp yüklemiştir (Şekil 5).



Şekil 5. SSCP jeline izole edilen 60 adet klon DNA'sının görünümü

SSCP jellerinde aynı gözükten klon tiplerinden 2 örnek seçilerek bu örneklerin plasmid izolasyonlarının DNA dizileri belirlenmiştir. Elde edilen sekanslardan ortak bir sekans oluşturulmuştur. Bu ortak sekansın bilinen direnç genlerine olan dizin benzerliği internette tBlastx programı kullanılarak belirlenmiştir. Bu programdan çıkan sonuç, ortak dizinin bir direnç geni homoloğuna % 74 düzeyinde benzerlik göstermekte olduğu tespit edilmiştir. Ortak sekansın amino asit dizinine bakıldığında NBS tipi direnç genlerinde görülen muhafaza edilmiş bir amino asit motifinin bulunduğu görülmektedir (Şekil 6). Ancak bu direnç geni motifinden 40 amino asit önce bir stop kodonu bulunmaktadır. Bu stop kodonunun varlığı, elde edilen sekansın bir pseudo-gen olabileceğini göstermektedir.


```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
+1 2.290.99. ....T.....
+2 2.290.99. ....T.....
+3 2.290.99. ....C.....
+4 2.290.99. ....T.....
+5 2.290.99. ....T.C.....
-6 2.290.152 .....G.....
+7 2.290.152 .....T.....
+8 2.290.152 .....T.....
+9 2.290.152 .....T.....
+10 2.290.152 .....T.....
-11 2.290.152 .....G.....
CONSENSUS GTTTACTCGAATCTCAACCCGAAAGTATAGATCCCATTAAGGTCCTTAGTAAAAATTGCCGAGGAAGTTATAGAGATAGAGGGGAGATCAGGCACATCAAAGAAGT
+ Frame 3   L L D S Q P E S I D P I R S L V K L P R K L * R * R G R S G T S K H

      120     130     140     150     160     170     180     190     200     210 220
+1 2.290.99. ....
+2 2.290.99. ....
+3 2.290.99. ....
+4 2.290.99. ....
+5 2.290.99. ....
-6 2.290.152 .....
+7 2.290.152 .....
+8 2.290.152 .....
+9 2.290.152 .....
+10 2.290.152 .....
-11 2.290.152 .....
CONSENSUS ATTTATTGGAGTACTATAGTCCCAACCCATAGAAATCAGCATCCAGAGGTTGATAGCCAGCGATGAGGACCTTCTCGGAATTGCTGAAAACAGGGGCAAGTTGAC
+ Frame 3   F I G V L * S N P L E M S M Q R L I G S D E D L V G I G E R R G K L T

      230     240     250     260     270     280     290
+1 2.290.99. ....G.....T.
+2 2.290.99. ....G.....T.
+3 2.290.99. ....G.....G.....
+4 2.290.99. ....G.....T.....
+5 2.290.99. ....C.....C.....A.....G.....
-6 2.290.152 .....C.....A.....
+7 2.290.152 .....C.....A.....
+8 2.290.152 .....C.....A.....
+9 2.290.152 .....C.....T.....
+10 2.290.152 .....C.....T.....
-11 2.290.152 .....A.....
CONSENSUS TGGCTGATCAACCGATGAAAAGAAACCCAGAGTACAGTTCTCGTATGGGGGCTTAGCCAAAACAC
+ Frame 3   W L I T D E K E T T V I T V S G M G C L G K T T

```

Şekil 6. Dizi analiz sonucu NBS2 290 için 12 plazmidten elde edilen DNA dizilerinin eşleştirmesi ve bunlarda ortak olan amino asit dizileri

Tablo 10. NBS3 290 ve NBS2 290 için homoloji sonuçları

Tahmin edilen gen	Homoloji	Tür
NBS/LRR tip dayanıklılık proteini	%75	<i>Zea mays</i>
NBS/LRR tip dayanıklılık proteini	%87	<i>Hordeum vulgare</i>
NBS/LRR tip dayanıklılık proteini	%68	<i>Oryza sativa</i>
RPR 1	%84	<i>Oryza sativa</i>
Dayanıklılık geni 9N ve 1A	%62	<i>Brassica napus</i>
LRR14	%60	<i>Triticum aestivum</i>
RPM1	%59	<i>Arabidopsis thaliana</i>
NBS/LRR tip dayanıklılık proteini	%58	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Rust dayanıklılık proteini M	%60	<i>Linum usitatissimum</i>
Dayanıklılık proteini RPP13	%66	<i>Arabidopsis thaliana</i>

Tablo 11. BS2 350 için homoloji sonuçları

Tahmin edilen gen	Homoloji	Tür
NBS/LRR tip dayanıklılık proteini	%85	<i>Hordeum vulgare</i>
NBS/LRR tip dayanıklılık proteini	%83	<i>Oryza sativa</i>
NBS/LRR tip dayanıklılık proteini	%81	<i>Oryza sativa</i>
RPM1	%56	<i>Sorgum bicolor</i>
Pib	%57	<i>Oryza sativa</i>
Yr10	%54	<i>Triticum aestivum</i>

Elde edilen bantların ifade edilen bir gen olup olmadıklarını anlamak için cDNA ile NBS profillemeye gerçekleştirilmesine karar verilmiştir. Alt-populasyondan RNA elde edilip bu RNA ile cDNA sentezi SuperScript sistemini kullanarak gerçekleştirilmiştir. Bu cDNA ile NBS profillemesi gerçekleştirildi. Alt-populasyonu karakterize etmek üzere kullanılan SSR markorleri ve NBS-profillemeye kombinasyonları bu markorleri istatistik olarak kabul edilebilir hale getirmek üzere populasyonun geri kalanında kullanılmıştır.

Klonlanan her bir NBS bandı için 6 plazmid sekanslanmıştır. Elde edilen sekanslar DNA homolojisi ve amino asit homolojisinin anlaşılması amacıyla BLASTX programı ile NCBI data bankasında bilinen dayanıklılık genleri ile kıyaslanmıştır. Kıyaslama sonuçları Tablo 10 ve 11'de detaylı olarak verilmiştir. Sekans sonuçları, şu an bilinen ve dayanıklılıkla ilişkili olduğu tahmin edilen NBS-LRR tip genlerle kuvvetli bağlantı göstermektedir. Bu da NBS profillemeye tekniğinin dayanıklı gen analoglarını tetkik etmede kullanışlı bir yöntem olduğunu işaret etmektedir.

Bu projede kullanılan mikrosatellit primerleri (Wmc522, Wmc170, Gwm273-1B, ve Gwm 95) ile tüm hatlar tarandığında bireyler arasındaki yüksek polimorfizm poliakrilamit jel analizinde ortaya çıkmıştır. Bu yüksek polimorfizmin varlığı bu primerlerin markör yardımıyla seçim çalışmalarında etkin olarak kullanılabilceğini göstermektedir. Yalnız, TÜBİTAK proje başvurusunda istenilen ödeneğin altında bir destek çıktığı için ve ayrılan ödenek ve diğer kurumlardan sağlanan desteklerle elimizde bulunan 150 hattın ancak 53 hattlık bir alt örneğinde çalışılmak durumunda kalmıştır. Bu da daha az doymun olan genetik bağlantı ve QTL haritalamasının elde edilmesine neden olmuştur. Genetik bağlantı ve QTL haritalarının daha doymun hale (genetik belirteçler arasındaki mesafenin 1cM'a kadar indirgenmesi) getirebilmek ve genetik belirteç destekli sarı pasa dayanıklılık ıslah çalışmalarını etkin yürütebilmek için, projede kullanılan ve hatlar arasında ayrışım gösteren mikrosatellit primerleri (Wmc522, Wmc170, Gwm273-1B, ve Gwm 95) ilave primerlerle tüm hatlar taranması gerektiğinin önemini ortaya koymuştur. Bu projede elde edilen bilgiler ışığında, maddi destek bulunduğu takdirde söz konusu çalışmalara devam edilecektir.

5. Tartışma

Kuraklığa daha dayanıklı olduğu için Türkiye'de buğdayın tercih edildiği fakir ya da marjinal tarım alanlar için, çeşit seçimi yaparken hastalıklara dayanıklı genler içeren buğday çeşitlerinin kullanılması ekonomik olarak en iyi opsiyonlardan biridir. Bu yüzden, sarı pas hastalığının makarnalık buğday tarımında kontrolü bakımından güvenilir, sarı pas hastalığına dayanıklı genlerin makarnalık buğday ıslahına entegre edilmesi ekonomik ve çevre dostu bir yaklaşım olacaktır (GÖÇMEN, 2001). Bu çalışmada, genetik belirteçler yardımıyla (Markörler) sarı pasa dayanıklılığı kodlayan genlerin genom içindeki yeri ve işlevi belirlenmeye çalışılmıştır.

Kunduru-1149 X Cham-1 melezinde arazide olgun fertlerde belirlenen sarı pas dayanıklılık genlerinin (GÖÇMEN ve ark., 2003) büyük bir bölümü fidan aşamasında da gözlenmiştir. Çalışılan Kunduru-1149 X Cham-1 melez popülasyonunda WYR 85/22 sarı pas ırkının gözlenen virulent profili, fidan aşamasında görülen sarı pasa dayanıklılık genlerinin sadece *Yr2*, *Yr6*, *Yr7* ya da *Yr9* genlerinden kaynaklanmayıp diğer "major" ve "minor" etkili genlerin ortaklaşa

sağladıkları kompleks bir dayanıklılık sisteminin varlığını işaret etmektedir. İstatistik anlamda önemli ($\chi^2 = 0.21$) bulunan genetik ayrışma oranları (Dayanıklı Hassas oranı=of 17.75:1), bu populasyonda en az 2 QTL “major” genin varlığını göstermektedir. Bağıntı ve QTL analizleri de bunu desteklemektedir. Sarı pasa dayanıklılıkla ilintili olan SSR ve NBS-Profiling genetik belirteçleri kullanılarak, *Join Map* programı ile yapılan bağıntı ve QTL analiz sonuçları, 3 bağıntı grubu ortaya çıkarmıştır. Birinci bağıntı grubunda, 4 NBS genetik belirteçi (NBS2 350, NBS2 750, NBS3 350 ve NBS3 800) yer almıştır. İkinci grubda ise, kromozom 1 üzerinde bulunan 3 SSR genetik belirteçi (BARC188, GWM268 and GWM153) ve NBS-Profiling markör NBS3 290 önemli bağıntı göstermiştir. Üçüncü grupta ise, aynı kromozomda (7B) olduğu bilinen 2 SSR markörü (GWM297, GWM333) aynı bağıntı grubunda bulunmuştur. Bu bağıntı gruplarından, bağıntı grubu 2’deki NBS3 290 markörü ile (Şekil 7), bağıntı grubu oluşturmayan markörlerden WMC 156 ile BARC 181 markörlerinin yüksek düzeyde sarı pasa dayanıklılıkla ilintili olduğu bulunmuş ve olası QTL’lerin yerlerinin bilinmesi bakımından bu markörlerin önemini ortaya koymaktadır.

NBS2 290 markörü ile sarı pasa dayanıklılık sağlayan “major” etkili QTL’in önemli bağıntı göstermesi süpriz olamamıştır. Çünkü NBS-LRR genleri, hastalıklara dayanıklılıkla ilgili olarak bitkilerde en sık bulunan gen ailelerinden birisidir. Hastalıklara dayanıklılık dışında başka birfonksiyon tespit edilemediğinden tamamen bitki savunması ile ilgili oldukları düşünülmektedir (AYLIFFE ve LAGUDAH, 2004). Pirinç genomunda 600 adet NBS-LRR geni bulunmuş olup, buğday genomunun pirinç genomunun 35 katı olduğu düşünüldüğünde bu sayının buğdayda daha da fazla olması beklenebilir. Ancak, buğday genomeundaki kodlanmayan bölgelerin fazlalığı dikkate alındığında (bir başka deyimle, fazlalığın çok büyük bir kısmını kodlanmayan DNA oluşturduğundan), NBS-LRR gen sayısının diploid bir buğday için de bu sayıya yakın olacağı tahmin edilmektedir. Dolayısıyla, tetraploid özellik taşıyan makarnalık buğdayda tahmin edilen gen sayısı 1200’dür. Yapılan bir çalışmada (DİLBİRLİĞİ ve ark., 2004) buğdayda dayanıklı gen sayısı 184 olarak tespit edilmiş, bunların 87 tanesinin NBS-LRR tip gen olduğu bulunmuştur. Sayının bu kadar küçük olması, NBS-profiling metodununun kullanımını sınırlamaktadır. Dolayısıyla bu sınırlı teknik çerçevesinde kullanılan buğday populasyonunun taranıp, elde edilen polimorfizmlerin istatistik olarak kullanılır nitelikte olması bu metodu çok daha değerli kılmaktadır.

SSR ve NBS-profiling markörlerinin analizi sonucunda 1B kromozomunun uzun kolunda 2 adet QTL (kantitatif özellik lokusu) bulunmuştur (Şekil 7). Buğday ıslahında birinci kromozom birçok hastalığa karşı dayanıklılık, biotik stres, tane kalitesi ile ilişkili genleri, taşıdığından özel önem taşır (NACHIT ve ark, 2001). Bütün bunlar ışığında, karakterize edilen 2 adet kantitatif özellik lokusunun dayanıklılıkla ilişkili genleri içerebileceğini destekler niteliktedir. Bu 2 QTL daha fazla araştırma ile tahıl ıslahında yararlı (kullanılabilir) 2 gen haline getirilebilir niteliktedir. Bu 2 gen Türkiye’de oldukça fazla tahıl kayıplarına sebebiyet veren sarı pas hastalığına karşı kullanılabilir direnç genleri olabilir. Bu ışık altında, bu çalışmanın ortaya koyduğu sonuçlar maktarnalık buğday ılsahı yapan buğday ıslahçıları ile ortak programlar oluşturularak sonuçların kısa sürede sarı pasa dayanıklı buğday tarımına yararlı hale gelmesi sağlanabilir (Yıldırım ve ark., 2004).

Genel olarak NBS LRR tip dayanıklılık genleri arasındaki homoloji küçük korunmuş motiflerle sınırlı olup, genler arasına serpiştirilmiş kısımlarda ise büyük ölçüde çeşitliliğe rastlanmaktadır (DİLBİRLİĞİ ve GILL, 2003). Çalışmamız sonucunda klonlanan polimorfik NBS profiling bantları, NCBI veri bankasındaki dayanıklılık genlerinin sekansı ile büyük ölçüde homoloji göstermektedir. Sekansı elde edilen üç adet NBS bandından iki tanesinin (NBS2 290 ve NBS3 290) çok sayıda “sonlandırıcı” kodonu içeren proteinleri kodladığı, dolayısıyla hiçbirinin NBS-LRR genlerini temsil etmediği görülmüştür. Klonlanan bantların direnç genlerinin bir parçası olmadıkları halde yinede NBS direnç genlerinin korunmuş motiflerinden bazılarını taşımaları NBS tipi direnç genlerinin zaman içerisinde genomun bazı bölgelerinde yoğunlaşmış olup mutasyonlar ile evrimleşerek yeni genler oluşturdukları düşencesini desteklemektedir. Bu bantlar, direnç genlerinin birer parçaları olmamalarına rağmen, direnç genleriyle önemli bağıntı gösterecek yakınlıktadır.

Sonuç olarak, dört ana gen ile açıklanabilen, yüksek derecede bir fide dayanıklılığı popülasyonda tespit edilmiştir. Birinci kromozomun uzun kolunda iki adet QTL’e (kantitatif özellik lokusu) rastlanmıştır. Bunlara ek olarak üç adet NBS-profiling bandı klonlanarak sekanslanmıştır. Bu sekansların, bitkilerde bilinen ve tahmin edilen NBS-LRR tip dayanıklılık genleri ile yüksek oranda homoloji gösterdiği bulunmuştur. Bu sonuç da, NBS-profiling metodunun RGA’ları

(dayanıklı gen analogları) tespit etmede kullanışlı bir markör sistemi olduğunu kanıtlar niteliktedir.

6. Kaynaklar

AYLIFFE, M.A., ve Lagudah, E.S., Molecular genetics of disease resistance in cereals, *Annals of Botany*, vol.94, pp. 765-773 (2004).

CAMPBELL, B.T., Baenziger, P.S., Gill, K.S., Eskridge, K.M., Budak, H., Erayman, M., Dweikat, I., ve Yen, Y., Identification of QTLs and environmental interactions associated with agronomic traits on chromosome 3A of wheat. *Crop Science*, Vol. 43, 493-1505, (2003).

BUDAK, H., Shearman, R.C., Parmaksiz, I., ve Dweikat, I., Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalograss based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs, SRAPs. *Theoretical and Applied Genetics Vol.* 109, 280-288, (2004).

BOYD, L.A., Can Robigus defeat an old enemy?- Yellow rust of Wheat, *Journal of Agricultural Science*, Vol. 143, 233-243, (2005).

BRADSLEY, D. ve Thomas, I., Valuing local wheat landraces for agrobiodiversity conservation in Northeast Turkey, *Agriculture, Ecosystems and Environment*, Vol. 106, 407-412, (2005).

DİLBİRLİĞİ, M.M., ve Gill, K.S., Identification of analysis of expressed resistance gene sequences in wheat, *Plant Molecular Biology*, Vol.53, pp.771-787 (2003).

DİLBİRLİĞİ, M.M., Erayman, D., Sandhu, D., Sidhu, D., Gill, K.S. Identification of wheat chromosomal regions containing expressed resistance genes, *Genetics*, vol.166, pp. 461-481 (2004).

GÖÇMEN, B., *Genetic characterization of 150 F6-inbred Durum wheat lines derived from Kunduru-1149 x Cham-1 cross lines using molecular markers and economically important traits*, (Doktora Tezi), OrtaDoğu Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi, (2001).

GÖÇMEN, B., Albustan S., Kaya Z., Keskin S., ve Taşkın V., Response of 150 F6 inbred durum wheat lines derived from Kunduru-1149 x Cham-1 cross to yellow rust (*Puccinia striiformis*), *Crop Protection*, Vol. 22, 787-793, (2003).

KAYA Z, ve Neale D., Linkage map based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Pinus brutia*, *Silvae Genetica* 44, 110-116, (1995).

LINE, R.F., Stripe rust of wheat and barley in North America: A retrospective historical review, *Annual Review of Phytopathology*, Vol. 40, pp. 75-118 (2002).

NACHIT, M.M., Elouafi, I., Pagnotta, M.A., El Saleh, A., Iacono, E., Labhilili, M., Asbati, A., Azrak, M., Hazzam, H., Benschel, D., Khairallah, M., Ribaut, J.M., Tanzarella, O.A., Porceddu,

- E., Sorrells, M.E., Molecular linkage map for an intraspecific recombinant inbred population of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum), *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 102, pp.177-186 (2001).
- PAN, Q., Wendel, J. ve Fluhr, R. Divergent evolution of plant NBS/LRR resistance gene homologous in dicot and cereal genomes. *J. Mol. Evol.* 50: 203-213 (2000).
- PENUELA, S., Danesh, D. ve Young N.D. Targetted isolation, sequence analysis and physical mapping non-TIR NBS-LRR genes in soybean, *Theor. Appl. Genet.* 104: 261-272, (2002).
- RICHTER, T.E. ve Ronald, P.C., The evolution of disease resistance genes, *Plant Mol. Biol.* 42: 195-20 (2000).
- ROELFS, A.P., Singh, R.P. ve Saari, E.E. 1992, Rust Diseases of Wheat: Concepts and methods of disease management ,Mexico, D.F.:CIMMYT. 81 pages. 4, (2000).
- SEAH, S., Sivasithamparam, K., Karakousis, A. ve Lagudah, E.S. Cloning and characterization of a family of disease resistance gene analogs from wheat and barley, *Theor. Appl. Genet.*97: 937-945, (1998).
- SINGH, R.P. ve S. Rajaram, "Breeding for disease resistance in wheat" from 'Bread wheat: improvement and production', FAO plant production and protection series, No. 30, FAO document repository, www.fao.org (2002).
- SRIVASTAVA, J.P., Durum wheat : its world status and potential in the Middle East and North Africa, *Rachis* 3: 1-8 (1984).
- TUFAN, H., *Characterization of Yellow Rust Puccinia striiformis Resistance in a F6 Durum Wheat Population*, (Master Tezi), Boğaziçi Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, (2006).
- VAN DER LINDEN, C.G., Wouters D.C.A.E., Milhalka V., Kochieva E.Z., Smulders M.J.M. and Vosman B., Efficient targeting of plant disease resistant loci using NBS profiling, *Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 109, 384-393, (2004).
- YILDIRIM, A., Karadag Y., Sakin, M.A., Gökmen, S., Kandemir, N. Akkaya, M.S., ve Yildirim, F., Transfer of stripe rust resistance gene Yr26 to Turkish wheats using microsatellite markers., *Cereal Research Communications*, Vol., 32 , 25-30, (2004).

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Kodu: TBAG-2357-103T178
Proje Başlığı: Kunderu-1149 X Cham-1 melezinden geliştirilen F ₆ populasyonunda sarı pas hastalığına dayanıklılık RGA'ların (dayanıklı gen analogları) belirlenmesi ve ıslah programlarında kullanımı: I-Makarnalık buğdayda sarı pasa dayanıklı genlerin tanımlanması
Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Yürütücü: Prof. Dr. Zeki Kaya ODTÜ Yürütücü yardımcısı: Doç. Dr. Müge Sayar → Boğaziçi Araştırmacılar: Hale Tufan, Elif Özcan, Y.Doç.Dr. Belgin Göçmen, Ayten Dizkırıcı, Dr. Taner Akar
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: ODTÜ Biyolojik Bilimler Bölümü/ANKARA ve Boğaziçi Üniversitesi Biyoloji Bölümü/İSTANBUL
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: Tübitak TBAG. Tunus Cad. No:80 06100, Kavaklıdere/ ANKARA
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: Mayıs 2004 – Mayıs 2006
Öz (en çok 70 kelime) Kunderu-1149 x Cham-1 melezlenmesi ile geliştirilmiş, 150 hatlık F ₆ durum buğday populasyonu bir sarı pas izolatu kullanılarak fidan ve olgun evrelerde dayanıklılık açısından fenotipik olarak değerlendirilmiştir. Test sonucu oluşan kategorilere dayanarak, 150 hattın 53'ü bir alt populasyon olarak seçilmiş, ve bu populasyonlarda SSR ve NBS (nukleotid bağlanma bölgeleri)-profilleme teknikleri kullanılarak genetik belirteç (marker) çalışmalarında kullanılmıştır. Yapılan genetik bağlantı analizleri sonucu, üç bağlantı grubu belirlenmiştir. Yapılan QTL analizi sonucunda, 1BL kromozomunda NBS3 290 NBS-profilleme bantının yanı sıra 3 SSR belirteçinde bulunduğu bağlantı grubunda 2 QTL belirlenmiştir. 1BL kromozomunda QTL ile yüksek ilinti gösteren NBS3 290 bantı için yapılan dizi ve BLASTX değerlendirmeleri sonunda, NBS-profilleme bantlarının tümünün bilinen NBS-LRR tipi dayanıklılık genlerine homoloji gösterdikleri görülmüştür. DNA dizin homolojisi ve bağlantı analizi sonucunda 1BL bölgesinde iki adet QTL bulunduğu sonucuna varılmıştır.
Anahtar Kelimeler: Durum buğdayı, <i>Puccinia striiformis</i> , sarı pas, NBS-profilleme, SSR belirteçi, QTL analizi.
Projeden Kaynaklanan Yayınlar: TUFAN, H., "NBS-profiling: a valid marker system for stripe rust resistance characterization in durum wheat" Poster sunumu, Annual Science Meeting, 12-14 Ekim, İNGİLTERE, (2005). TUFAN, H., "Characterization of Yellow Rust <i>Puccinia striiformis</i> Resistance in a F ₆ Durum Wheat Population", (Master Tezi), Boğaziçi Üniversitesi –Mol. Biy. ve Genetik Bölümü, (2006). TUFAN, H, Sayar M., MacCormack, R. Gocmen B., Kaya Z., ve Boyd L.A., "Characterization of Yellow Rust Resistance in a Durum Wheat Population using NBS-Profiling ", Theoretical and Applied Genetics (2006) (Dergiye sunuldu ve değerlendirme aşamasında). DİZKIRICI, A., "Genetic Diversity of Scald (<i>Rhynchosporium secalis</i>) Disease Resistant and Sensitive Turkish Barley Seed Sources as Determined with Simple Sequence Repeats", (Master Tezi), ODTÜ-Biyolojik. Bilimler Bölümü (2006)
Bilim Dalı: Moleküler Biyoloji Doçentlik B. Dalı Kodu: 401.02.02