



MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DOMATES *fw2.2* VERİM GENİNİN BUĞDAY ORTOLOGLARININ
KLONLANMASI VE ÖNEMLİ BUĞDAY ÇEŞİTLERİNİN GENOMİK VE
FONKSİYONEL GENOMİK BAZINDA *fw2.2* BUĞDAY ORTOLOGU İLE
TARANMASI**

Emre İLHAN

DOKTORA TEZİ

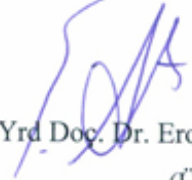
Antakya/HATAY
HAZİRAN-2013

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOMATES *fw2.2* VERİM GENİNİN BUĞDAY ORTOLOGLARININ
KLONLANMASI VE ÖNEMLİ BUĞDAY ÇEŞİTLERİNİN GENOMİK VE
FONKSİYONEL GENOMİK BAZINDA *fw2.2* BUĞDAY ORTOLOGU İLE
TARANMASI**

EMRE İLHAN
DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Mustafa ERAYMAN danışmanlığında hazırlanan bu tez 17.06.2013 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

 Prof. Dr. Mustafa ERAYMAN (Başkan)	 Doç. Dr. Mehmet ATAĞ (Üye)	 Yrd. Doç. Dr. Hayri BABA (Üye)	
 Yrd. Doç. Dr. Cahit ERDOĞAN (Üye)			 Yrd. Doç. Dr. Erol ATAY (Üye)

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No: 35


Doç. Dr. İsmail Hakkı KARAHAN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma TÜBİTAK - TOVAG tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 108 O 465

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	I
ABSTRACT	II
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
1. GİRİŞ	1
1.1. Ortolog Genler ve Ortologların Belirlenmesi.....	2
1.2. Real Time PCR.....	5
1.2.1. Eşik Döngü Değeri (Treshold Cycle, Ct).....	7
1.2.2. Kantitatif Verilerin Analizi	8
1.2.2.1. Absolute (Mutlak) Kantitasyon	8
1.2.2.2. Relatif (Karşılaştırmalı veya Göreceli) Kantitasyon	9
1.2.3. Housekeeping Genler ve Normalizasyon.....	10
1.3. Tek Nükleotid Farklılığı (SNP) ve Tespit Edilmesi	10
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	13
2.1. Buğday Verim Gen Bölgelerinin Analizi	13
2.2. Domates <i>fw2.2</i> Verim Geninin Özellikleri	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM	19
3.1. Bitki Materyalinin Elde Edilmesi	19
3.2. Bitkilerin Yetiştirilmesi, DNA ve RNA İçin Örneklerin Alınması	20
3.3. Toplam RNA İzolasyonu ve Saflaştırma.....	22
3.4. RNA İzolasyon Hazırlıkları.....	22

3.5.	RNA İzolasyonu	23
3.6.	RNA Konsantrasyonlarının Tespit Edilmesi	24
3.1.	Aday Gen Eldesi için Biyoinformatik Çalışmalar	25
3.2.	Çalışmada Kullanılan Primerlerin Tasarımı	27
3.3.	cDNA Sentezinin Yapılması	28
3.4.	cDNA'ların β – Actin Geni ile Belirlenmesi	28
3.5.	RT – PCR İle Gen İfade Analizi.....	29
3.6.	DNA İzolasyonu ve DNA'nın Elde Edilmesi	30
3.7.	DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi	31
3.8.	PCR Çalışması.....	32
3.9.	DNA'nın Jelden İzolasyonu	33
3.10.	DNA Dizi Analizinin Yapılması.....	34
3.11.	Verilerin Değerlendirilmesi	34
3.12.	SNP Bölgelerinin Analizi	35
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	36
4.1.	Aday Ortolog Genin Elde Edilmesi.....	36
4.2.	Toplam RNA Analizleri	37
4.3.	DNA Analizleri	43
4.4.	DNA Sekans Analizi	43
4.5.	SNP Analizleri.....	49
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	50
	KAYNAKLAR	53
	TEŞEKKÜR.....	57
	ÖZGEÇMİŞ	58
	EKLER.....	59

ÖZET**DOMATES *fw2.2* VERİM GENİNİN BUĞDAY ORTOLOGLARININ KLONLANMASI VE ÖNEMLİ BUĞDAY ÇEŞİTLERİNİN GENOMİK VE FONKSİYONEL GENOMİK BAZINDA *fw2.2* BUĞDAY ORTOLOGU İLE TARANMASI**

Son yıllarda nükleotid ve protein veri tabanlarının geliştirilmesi ortolog genlerin türler içinde ve türler arasında kullanılma ihtimalini doğurmuştur. Ortolog genlerin türler arasında benzer fonksiyona sahip oldukları düşünülmektedir. Domateste bulunan *fw2.2* geni domateste meyve ağırlığını artırması nedeniyle verim artışına doğrudan katkıda bulunan bir gendir. Bu genin buğdayda da bulunması ve farklı allellerinin tespiti çok karmaşık bir karakter olan verimi anlamamıza yardımcı olacaktır. Bu çalışmada ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitleri ile buğdayın yabani ataları ilgili genin buğdaydaki ortologu baz alınarak kullanılan primerler sayesinde gen ifade farklılıkları ve nükleotid polimorfizmleri incelenmiştir. Çalışma sonunda gen ifadesi yönünden tür ve çeşitler arasında büyük varyasyonlar görülmüş özellikle alternatif ekmeklik buğdayların gen ifadesi ile verim arasında negatif bir ilişki gözlenmiştir. Çeşitler arasında nükleotid polimorfizmleri belirlenmiş ve polimorfizm genin farklı bölgelerinde görülmüştür. Hem gen ifade farklılıkları hem de nükleotid polimorfizmindeki geniş varyasyon bu aday genin buğdayda fonksiyonel işaretleyici olarak kullanılma ihtimalini güçlendirmektedir. Bu genin buğdayın verim ve diğer agronomik karakterlerle ilişkilendirilmesi için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır. Farklı bir türden in silico yöntemlerle domateste bulunan bu genin buğday çeşit ve türlerin tespitinde kullanılabilme potansiyelinin araştırılması yönünden bu çalışma öncülük teşkil etmektedir.

2013, 67 sayfa

Anahtar Kelimeler: Buğday, Verim, *fw2.2*, RT-PCR, Ortolog gen

ABSTRACT**CLONING OF WHEAT ORTHOLOGOUS OF TOMATO *fw2.2* YIELD GENE
AND GENOMIC AND FUNCTIONAL GENOMIC ANALYSIS OF WHEAT
VARIETIES BY *fw2.2* WHEAT ORTHOLOGOUS**

Recent developments in nucleotide and protein databases have brought about the use of orthologous genes among and within species. Orthologous genes are expected to function similarly among species. Found in tomato, *fw2.2* gene is a single gene which directly contributed yield increase. Wheat ortholog of this gene and its alleles will enable us to understand complex feature of yield trait. In the present study, bread and durum wheats and their wild ancestors were screened using primers derived from wheat orthologs of tomato *fw2.2* and gene expression and nucleotide polymorphisms were investigated. Results showed that great variation existed among species and cultivars in terms of both gene expression and nucleotide polymorphism. There was also negative correlation between gene expressions and yield of alternative bread wheat varieties. There were nucleotide polymorphisms throughout the gene under investigation. Great variation in gene expressions and nucleotide polymorphism suggests that this gene could be used as a functional marker in wheat. Further investigation is needed to associate this gene with yield and other agronomic characteristics. To our best knowledge, this study is the first to attempt to use a tomato orthologous gene in wheat to differentiate and possibly identify wheat species and cultivars.

2013, 67 pages

Keywords: Wheat, Yield, *fw2.2*, RT-PCR, Ortholog gene

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi
BLAST	Temel Lokal Hiza Tarama Aracı
CAPS	Bölünerek Çoğaltılmış Polimorfik Dizi
cDNA	Tamamlayıcı DNA
Ct	Eşik Döngü Değeri
DEPC	Dietilpirokarbonat
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Dinükleotidtrifosfat
dsDNA	Çift İplikli DNA
DTT	Dithiothreitol
EST	Dizisi Etiketlenmiş Dizi
EtOH	Etanol
<i>fw2.2</i>	Meyve Ağırlığı
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HKG	Housekeeping Gen
NaCl	Sodyum Klorür
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
ng	Nanogram
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QTL	Kantitatif Özellikli Bölge
RFLP	Kesilmiş Parça Uzunluğu Polimorfizmi
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
RT – PCR	Real Time PCR
SNP	Tek Nükleotid Farklılığı
SSR	Basit Dizi Tekrarı
TE	Tris EDTA
T _m	Erime Sıcaklığı
μl	Mikrolitre

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan buğday çeşitleri	19
Çizelge 3.1. (Devamı) Çalışmada kullanılan buğday çeşitleri	19
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan buğday ata türlerinin menşeleri.....	20
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan genotiplere ait nanodrop ölçümleri	24
Çizelge 3.3. (Devamı) Çalışmada kullanılan genotiplere ait nanodrop ölçümleri	25
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan primerler.....	27
Çizelge 3.5. cDNA sentez karışımı	28
Çizelge 3.6. Genotiplere ait DNA konsantrasyonları.....	31
Çizelge 3.6. (Devamı) Genotiplere ait DNA konsantrasyonları	32
Çizelge 4.1. Çeşitlerin fw2.2-643 kodlu primerden elde edilen PCR ürününün nükleotit baz dizilenmesi sonucu elde edilen sonuçlar	44
Çizelge 4.1. (Devamı) Çeşitlerin fw2.2-643 kodlu primerden elde edilen PCR ürününün nükleotit baz dizilenmesi sonucu elde edilen sonuçlar	45
Çizelge 4.1. (Devamı) Çeşitlerin fw2.2-643 kodlu primerden elde edilen PCR ürününün nükleotit baz dizilenmesi sonucu elde edilen sonuçlar	46
Çizelge 4.1. (Devamı) Çeşitlerin fw2.2-643 kodlu primerden elde edilen PCR ürününün nükleotit baz dizilenmesi sonucu elde edilen sonuçlar	47
Çizelge 4.1. (Devamı) Çeşitlerin fw2.2-643 kodlu primerden elde edilen PCR ürününün nükleotit baz dizilenmesi sonucu elde edilen sonuçlar	48
Çizelge 4.2. Buğday aday fw2.2 bölgesinde tespit edilen SNP'ler	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. (a) S1 ve S2 gen ailesinin ve bunların bir duplikasyonun (yıldız işareti) şeması. (b) Ortolog grafiği	3
Şekil 1.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> L. genomundaki parçalı şekilde katlanmış bölgeler.....	4
Şekil 1.3. Real Time PCR’da DNA’ya bağlanan boya örneği (SYBR Green I).....	6
Şekil 1.4. Erime eğrisi analizi ve primer dimer oluşumu grafik gösterimi	7
Şekil 1.5. Real time PCR floresan deteksiyonu ve eşik döngü değerini kullanarak konsantrasyon ölçümü	8
Şekil 1.6. PCR amplifikasyon eğrisi ve standart eğri.....	9
Şekil 2.1. Buğday Verim Bileşenlerinin Kıyaslamalı (Fiziksel ve Genetik) Haritaları.....	14
Şekil 2.2. Çeşitli türlere ait bitkilerin meyve ve bitki büyüklükleri.....	15
Şekil 2.3. <i>L. esculentum</i> meyvelerinde <i>fw2.2</i> transgeninin fenotipik etkisi. (-) transgen içermeyen ve (+) <i>L. pimpinellifolium fw2.2</i> kozmidi içeren meyve	16
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan bitkilerin tarlada görünümü.....	21
Şekil 3.2. Buğday gelişim dönemleri ve Zadoks ölçeği (Anonymous, 2013e).....	21
Şekil 4.1. <i>H. vulgare</i> aday (AK370184), <i>T. aestivum</i> aday (AK336220), <i>L. esculentum</i> (AAO12188) ve <i>L. pimpinellifolium</i> (AAO12190) <i>fw2.2</i> ortolog geninin protein alignmenti.....	36
Şekil 4.2. Toplam RNA analizi sonuçlarının jel elektroforezinde görüntüsü	37
Şekil 4.3. Bazı çeşitlere ait cDNA’ların <i>fw2.2</i> -156 primeri PCR sonuçları	37
Şekil 4.4. Buğday çeşitlerine ait <i>fw2.2</i> geni ortologunun RT-PCR sonuçları.	38
Şekil 4.5. Buğday çeşitlerine ait β -actin geninin RT-PCR sonuçları.....	38
Şekil 4.6. <i>fw 2.2</i> -156 primerine ait melting curve analizi sonucu.	39
Şekil 4.7. β -actin geninin primerine ait melting curve analiz sonucu.....	39
Şekil 4.8. Ekmeklik buğday çeşitleri ve donör akrabalara ait gen ifade oranları.....	40
Şekil 4.9. Ekmeklik Buğday çeşitlerinden sahil kuşağına uygun olanların gen ifade oranlarıyla olan ilişkisi.	40

Şekil 4.10. Makarnalık buğday çeşitleri ve donör akrabalara ait gen ifade oranları.....	41
Şekil 4.11. Makarnalık Buğday çeşitlerinin gen ifade oranlarıyla olan ilişkisi	42
Şekil 4.12. Bazı çeşitlerin ait DNA'larıyla fw2.2-643 primeri ile yapılan PCR sonucu.....	43
Şekil 4.13. Ekmeklik buğdayda çeşitlerindeki <i>fw2.2</i> ortoloğunun dizi analizi sonucunda oluşan filogenetik ağaç.....	48
Şekil 4.14. Makarnalık buğdayda çeşitlerindeki <i>fw2.2</i> ortoloğunun dizi analizi sonucunda oluşan filogenetik ağaç.....	49

1. GİRİŞ

Tarım ve buna paralel olarak bitki ıslahı yaklaşık 10 – 15 bin yıldır insanoğlu tarafından yapılmaktadır. Bitkilerin kültüre alınmaya başlaması ile birlikte ıslah çalışmaları ile konulan ilk hedef ise daha iri ürün ve dolayısı ile birim alandan alınan verimin artırılmasıdır (Gill ve ark, 2004).

Buğday, tarımı yapılan bitkiler arasında ilk olarak kültüre alınan bitkidir (Wener ve ark, 1992). Yine buğday, çeltik (*Oryza sativa* L.), mısır (*Zea mays* L.) arpa (*Hordeum vulgare* L.) vb. bitkiler tarımı en çok yapılan tahıl türleri olup, tüm dünya nüfusunun günlük kalori ihtiyacının yaklaşık % 80'ini karşılamaktadırlar (Wendel, 2000). Buğday ise tek başına dünya nüfusunun günlük enerji ihtiyacının yaklaşık % 23'ünü karşılayan ve dünyada alan bazında en yaygın olarak yetiştirilen tahıldır (Pimental ve ark, 1997; FAO, 2006; USDA, 2008). Yapılan tahminlere göre insanlığın ihtiyacı olan buğday üretiminin 2050 yılında yeterli miktarda olabilmesi için bugünkü buğday üretiminin her yıl % 2 oranında artması gerekmektedir (Gill ve ark., 2004). Küresel iklim değişikliğinden kaynaklanan kuraklık ve yağış rejimi değişiklikleri yanında mevcut tarım alanlarının da son sınırlarına doğru yaklaştığı düşünüldüğünde, buğday dane biyolojisinin ve buğday bitkisinin verim mekanizmasının anlaşılmasının birim alandan alınan verimi artırmada ne kadar önemli olduğu daha da ortaya çıkmaktadır.

Buğday bitkisi için birim alandan alınan verimi artırmanın iki önemli yolu bulunmaktadır. Birincisi verimi artırmak, ikincisi ise ürün kayıplarını en aza indirmektedir. Üretimi artırmada; 20. yüzyıl boyunca gübre kullanımı ve mekanizasyonun pozitif etkilerinden kaynaklanan dramatik artışlar göz ardı edildiğinde buğdayda klasik ıslah metotları ile elde edilen verim artışının son 20 yılda dünyada sınırlı bir düzeyde kaldığı görülmektedir. 1989 yılında 1 milyar 903 milyon ton olan dünya hububat üretimi 2011 yılında 2 milyar 255 milyon ton'a yükselmiştir (FAO, 2012). Bu da son 15 – 20 yıldaki dünya tahıl üretiminin bir artış gösterdiği, ancak dünya tahıl üretim alanındaki artışta hesaba katıldığında birim alandan alınan verimdeki artış % 1 – 2 civarında kalmaktadır (FAO, 2012a).

Dünya buğday üretim ve verim rakamları da dünya tahıl değerleri ile benzerlik göstermektedir. 1992 yılında 561 milyon ton olan dünya buğday üretimi, 2011 yılında 656 milyon tona yükselmiştir. Buna göre son 20 yılda dünya buğday üretimi yalnızca % 16 artmıştır (FAO, 2012b). Bu da beklenen yıllık %2 verim artışının altında kalmaktadır.

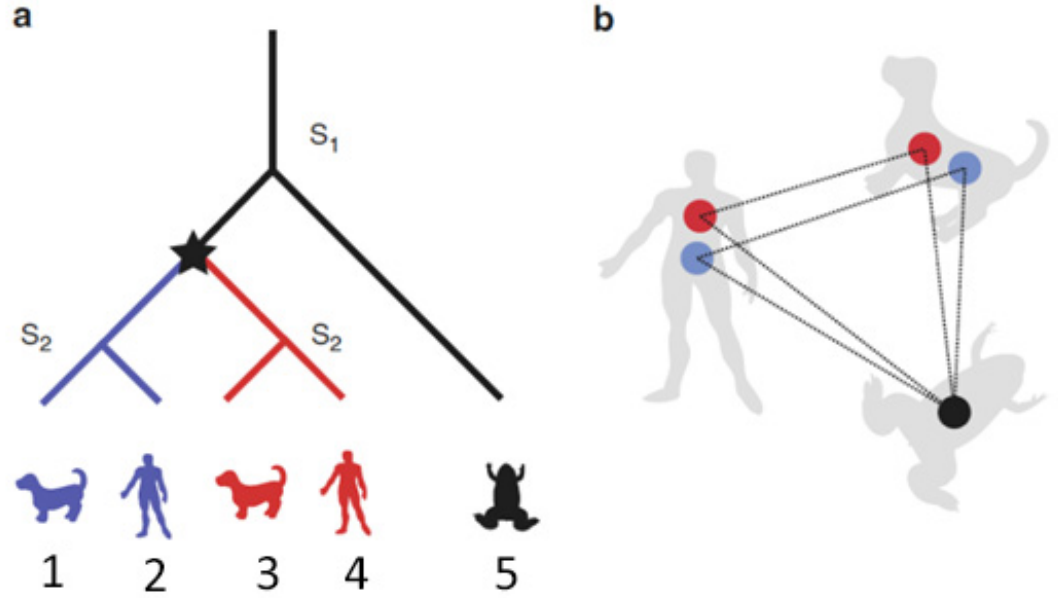
Ülkemiz buğday üretim ve verim değerlerine bakıldığında ise durum daha da olumsuzdur. Buğdayda verim artışını olumsuz etkileyen en önemli faktörlerin, kuraklık ve tarıma uygun olmayan eğimli ve kıraç alanların tarıma açılması olduğu düşünülse bile, son 20 yılda Türkiye buğday üretimi önemli bir artış göstermemiş, buğday veriminde ise önemli bir artış sağlanmamıştır. 1930 – 1950 döneminde ülkemizde 90 kg/da verim alınan buğdayda, 1970’li yıllardan sonra gübre kullanımına paralel olarak verim dramatik olarak artmış ve 178 kg/da civarına yükselmiştir. Gübre kullanımı 1976 – 1988 döneminde ise 5 kat artış göstermiş ve verim 1988 yılında 217 kg/da olarak gerçekleşmiştir. Son 20 yılda ise gübre kullanımı 2 kat artış göstermesine ve birçok yeni çeşit ıslah edilmesine rağmen buğday üretim ve veriminde önemli bir artış sağlanamamıştır. 2002’de verim ortalaması 209 kg/da, 2012 yılında ise 265 kg/da olarak gerçekleşmiştir (TUIK, 2013).

Özetle; klasik ıslah metotları ile birim alandaki buğday veriminde gözle görülür bir artış gözlenmesine karşın bu artış buğday verim potansiyelinin altında kalmaktadır. Dolayısı ile klasik ıslah metotları yanında buğdayda üretim ve verim artışı sağlamak için genomik çalışmaların buğday verim artışına ivme kazandıracağı beklenmektedir.

1.1. Ortolog Genler ve Ortologların Belirlenmesi

Ortoloji farklı türlerdeki benzer fonksiyon gösteren genleri belirlemek amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Gelişen teknolojiye paralel olarak farklı bitki genomlarının sekanslanması ile özellikle *Arabidopsis thaliana* L., yonca (*Medicago truncatula* Gaertn.) ve çeltik (*Oryza sativa* L.) gibi model bitki türlerinden model olmayan bitki türlerine fonksiyonel bilgilerinin transfer edilmesi amacıyla ortologlardan faydalanılmaktadır (Van Bel ve ark., 2012). Farklı genomlardaki genler arasındaki

ortoloji bu genler tarafından gösterilen sekans benzerliklerinin düzeyleriyle belirlenebilmektedir. Genomların sekans verilerinin artmasıyla birlikte varsayılan ortolojinin otomatik belirlenmesi metotları daha fazla önem kazanmaktadır. Ortologları belirlemek amacıyla yapılan bu metotlar genomun büyüklüğü ve duplikasyonla meydana getirilen ilişkinin kompleksliğine bağlı olarak zorlaşmaktadır. Günümüzde ortoloji iki farklı şekilde tespit edilmektedir (Chen ve ark., 2007). Bunlar dendograma (ağaç) dayalı metotlar ve grafiğe dayalı metotlardır. Ağaca dayalı olan metotta genler veya türler arasındaki ilişkiyi tespit etmek için filogenetik ağaçlar ve sekans benzerlikleri (alignment) kullanılır.

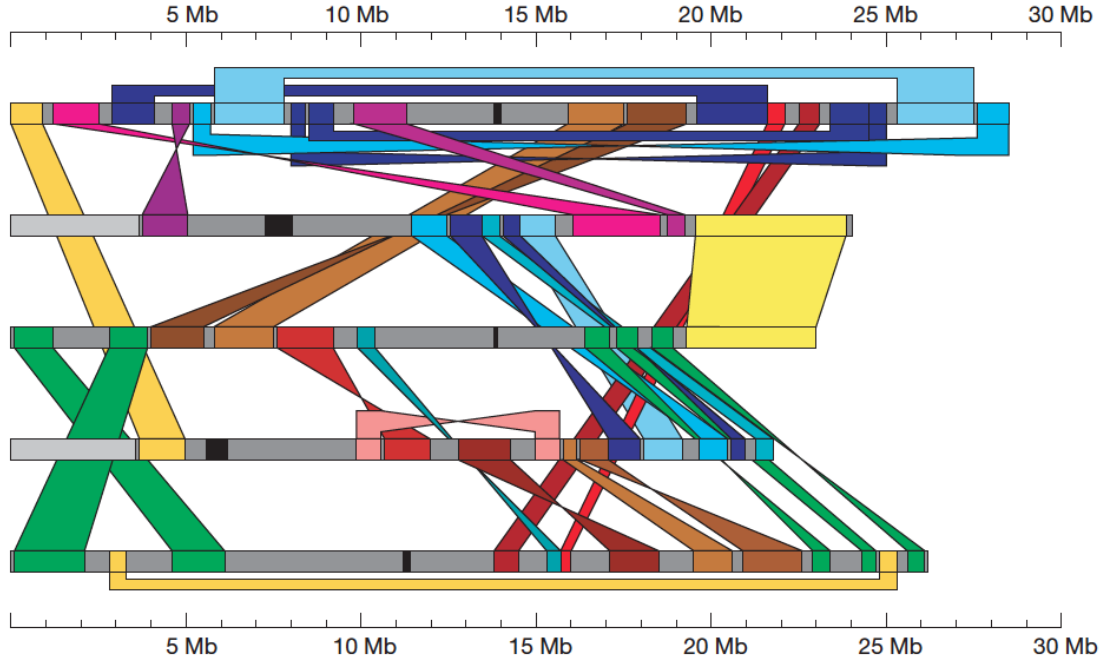


Şekil 1.1. (a) S1 ve S2 gen ailesinin ve bunların bir duplikasyonun (yıldız işareti) şeması. Ortolog ve paralog çiftlerini belirlemektedir. Kurbağa (5) geni diğer tüm genlere (1, 2, 3, 4) ortologdur. Kırmızı ve mavi genler (1, 2, 3, 4) kendi aralarında ortologdur, S2 geni (1 - 3 ve 2 - 4) kendi aralarında paralogdur (yıldız işareti). (b) Ortolog grafiği. Genler kenarlarla gösterilmiştir. Köşeler ise ortolojik ilişkiyi temsil etmektedir. Kurbağa geni hem insan hem de köpek genlerinin bu organizmaların her ikisinde birden fazla dizide ortologu olduğu için birden çoğa (one to many) olarak şekillenir. Bu durumda iki yönlü en iyi uyuma (Bidirectional best hit) yaklaşımı ilişkilerin birini kaplar (Altenhoff ve Dessimoz, 2012)

Güvenilmeyen ağaçlar ortolojinin ortaya çıkarılmasında bir dezavantaj olmaktadır. Güvenilir bir ağaç çoklu nükleotid dizi hizalamasına bağlıdır. Grafiğe dayalı metotta ise ortolojiyi belirleyebilmek için tam genom sekanslarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu işlem ise iki fazdan oluşmaktadır. Bunlardan ilki grafik yapma fazıdır ve bu işlemde ortolog gen çiftleri titizlikle ayırt edilir ve kenarlardan hizalanarak

eşleştirilir. Diğer faz ise kümeleme (clustering) fazıdır. Bu fazda ortolog gen grupları grafiğin yapısına dayanarak düzenlenir (Altenhoff ve Dessimoz, 2012) (Şekil 1.1.).

Hatalı gen veya genom dizileri ortolojinin tespit edilmesini güçleştirmektedir. Ortologların tespit edilmesinde karşılaşılan güçlüklerden bir diğeri ise gen ve genom duplikasyonları (poliploidi) olmaktadır. Gen duplikasyonları ökaryotik organizmalarda oldukça sık görülen bir olaydır. Gen duplikasyonları ardışık (tandem), parçalı (segmental) veya geniş ölçekli olarak tam genomu kapsayabilir. Gen duplikasyonları tekli genlerin katlanmış kopyalarını sağlamaktadır. Fakat tam genom duplikasyonları genomdaki bir genin her bir kopyasının katlanmasını sağlamaktadır. Poliploidi bitki türleri arasında meydana gelmektedir (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. *Arabidopsis thaliana* L. genomundaki parçalı şekilde katlanmış bölgeler. Gri renkli kısımlar kromozomları, renkli kısımlar ise katlanmış parçaların birleşimini göstermektedir (A.G.I, 2000)

Pek çok bitki türü geniş ölçekli tam genom duplikasyonuna sahiptir (Patel, 2011). Kapalı tohumlu bitkilerden olan *A. thaliana* L., soya fasulyesi (*Glycine max* Merr.), kavakgiller (*Populus* sp.), çeltik (*O. sativa* L.), arpa (*H. vulgare* L.), mısır (*Zea mays* L.), ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) geniş ölçekli tam genom duplikasyonuna sahiptir (Soltis ve ark., 2009). *T. aestivum* L., *M. truncatula* Gaertn., *O.*

sativa L., domates (*Lycopersicum esculentum* Mill.), akdarı (*Sorghum bicolor* L.), *Brachypodium distachyon* L., *G max* Merr. (Anonymous, 2013a) gibi monokotil ve dikotil bitkilerin veri tabanlarında tam genom sekansları mevcuttur. Bu amaçla NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Anonymous, 2013b) programını kullanarak bitki türleri arasındaki ortoloji, sekans benzerliklerine dayalı biyoinformatik olarak tespit edilebilmektedir.

1.2. Real Time PCR

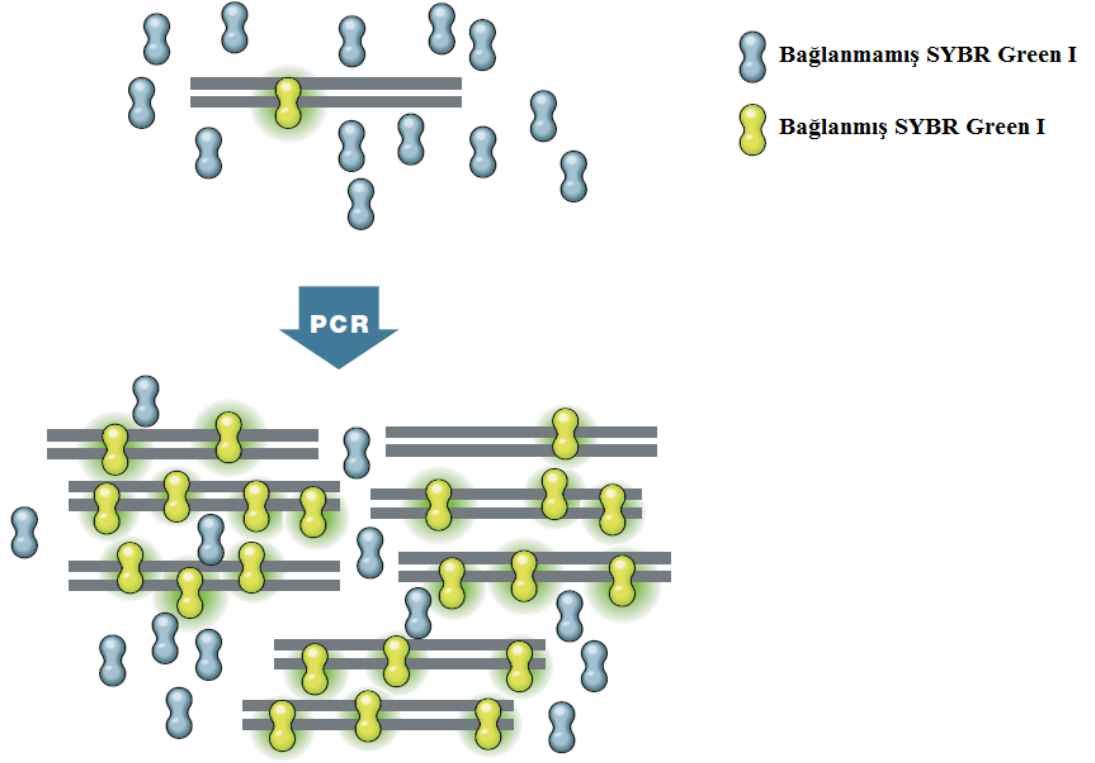
Real Time PCR nükleik asit amplifikasyonunun gerçek zamanlı olarak incelenmesine olanak veren bir PCR tekniğidir. Real Time PCR’da çoğaltılan ürünlerin miktarı floresan ışığa yapan bir molekül (SYBR Green boyası gibi) veya yıkıma bağlı sinyal oluşturan problemler (TaqMan probu gibi) kullanılarak ölçülmektedir. Her bir PCR döngüsü bitiminde tüpte oluşan çift zincirli nükleik asit ürününün miktarının ölçülmesini ve kantitatif analizlerinin yapılmasına olanak sağlar (Anonymous, 2013c; Arya ve ark., 2005).

Çoğaltılan ürünün (amplikonun) belirlenebilmesi için genel olarak 2 farklı kimyasal uygulanmaktadır. Bunlar DNA’ya bağlanan boyalar ve floresan problemlerdir. DNA’ya bağlanan boyalar olarak SYBR Green I veya Etidyum bromid (EtBr) kullanılmaktadır. Bu yöntem uygulamada çok kolay ve amplikona özgül etiketli hibridizasyon problemleri istenmediği için maliyet olarak çok ucuzdur. SYBR Green I sadece dsDNA’nın arasında girerek ışığa yapar (Şekil 1.3.). Bununla birlikte floresan sinyalinin yoğunluğu reaksiyonda dsDNA varlığının miktarına bağlıdır.

Bu metodun en önemli dezavantajı PCR reaksiyonu süresince oluşan tüm dsDNA’ya (özgül olmayan PCR ürünleri ve primer dimerleri gibi dsDNA) bağlanmaktadır (Arya ve ark., 2005).

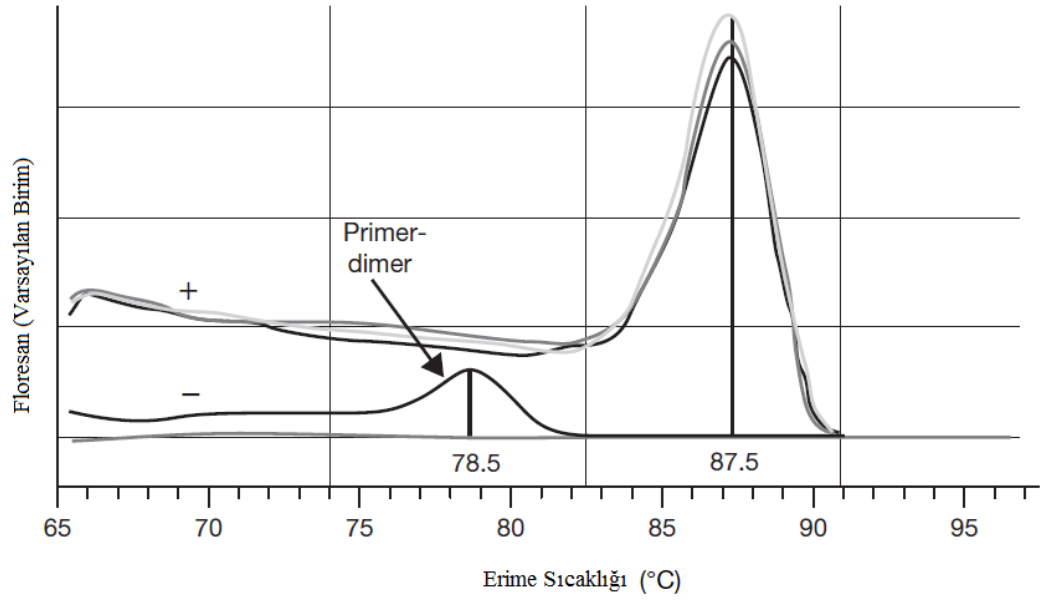
Bu yöntemde en önemli nokta PCR primerlerinin özgül cDNA’ya bağlanması, özgül olmayan amplikon üretmemesi veya primer dimeri oluşturmamasıdır (Yüzbaşıoğlu, 2008). Primer tasarlama aşamasında özgül bir amplifikasyon elde etmek için cDNA dizisinin uygun bölgelerinden seçilmesi ve amplikon uzunluğunun 100 –

250 baz çifti uzunluğunda olması gerekmektedir (Wang ve Seed, 2006). Ayrıca RNA izolasyon aşamasında genomik DNA bulaşığının olması SYBR Green I'in uygulanmasını engelleyen bir diğer unsurdur (Yüzbaşıoğlu, 2008).



Şekil 1.3. Real Time PCR'da DNA'ya bağlanan boya örneği (SYBR Green I) (Anonymous, 2013d)

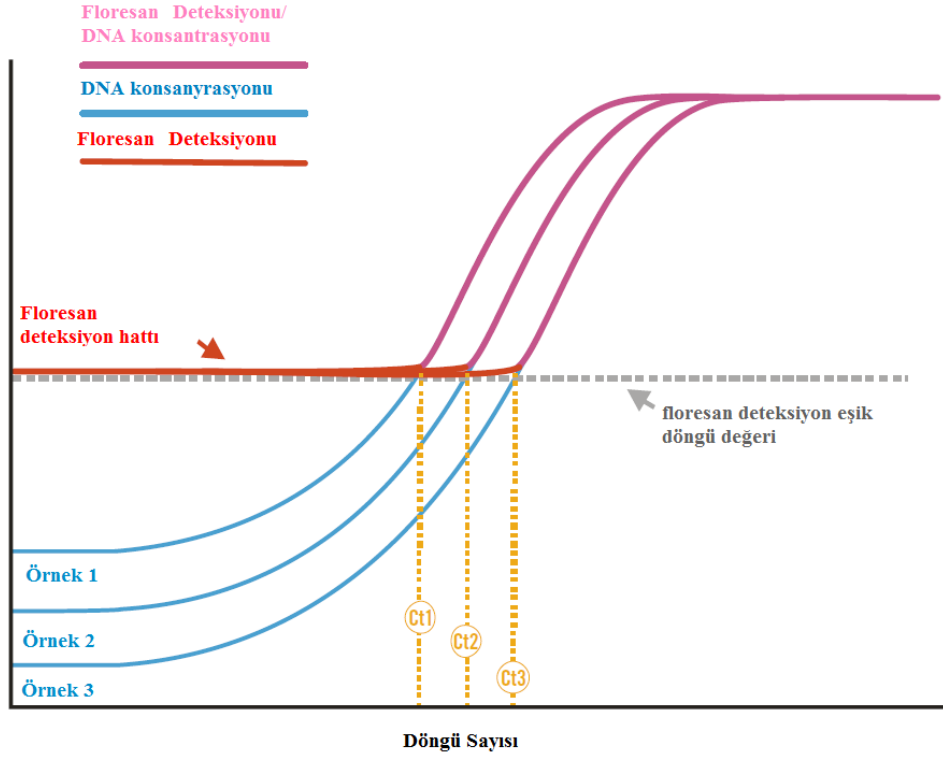
SYBR Green I yönteminde özgül olmayan amplifikasyon ürünlerinin ve primer dimerlerinin kontrolü için agaroz jel elektroforezinden yararlanılmaktadır. Ayrıca bu sorunların tespiti için başka bir analiz daha yapılabilmektedir. Melting curve (Erime eğrisi) analizinde her çift zincirli DNA kendine özgü bir erime sıcaklığına (melting temperature, T_m) sahiptir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra sıcaklığı belli aralıklarla ve belli oranda yükselterek floresan miktarı belirlenmektedir. Çift zincirli DNA ayrışmaya başladığında araya girmiş olan boya serbest hale geçerek floresan ışıma yapar. Bu ışımanın miktarından elde edilen erime eğrisinden faydalanılarak amplifikasyonun özgüllüğü belirlenmektedir. T_m değerinin tam olarak saptanabilmesi için erime eğrisinin zamana karşı türevinde faydalanılmaktadır (Şekil 1.4.) (Yüzbaşıoğlu, 2008).



Şekil 1.4. Erime eğrisi analizi ve primer dimer oluşumu grafik gösterimi (Ponchel, 2006)

1.2.1. Eşik Döngü Değeri (Treshold Cycle, Ct)

Real Time PCR için önemli bir parametredir. Reaksiyonun floresan sinyali eşik noktasını kesiştiği andaki döngü sayısı olarak geçmektedir (Anonymous, 2013d). Başka bir ifadeyle, reaksiyondaki ilk anlamlı artışın olduğu döngü sayısıdır. Ct değeri örnekteki nükleik asidin miktarıyla ters orantılıdır. Yani örnekteki nükleik asidin miktarı ne kadar fazla ise Ct'nin değeri o oranda azalacaktır. Dolayısıyla başlangıç DNA konsantrasyonu Ct değerini belirlemede önemlidir (Şekil 1.5.) (Arya ve ark., 2005; Anonymous, 2013c; Anonymous, 2013d).



Şekil 1.5. Real time PCR floresan deteksiyonu ve eşik döngü değerini kullanarak konsantrasyon ölçümü (Anonymous, 2013c)

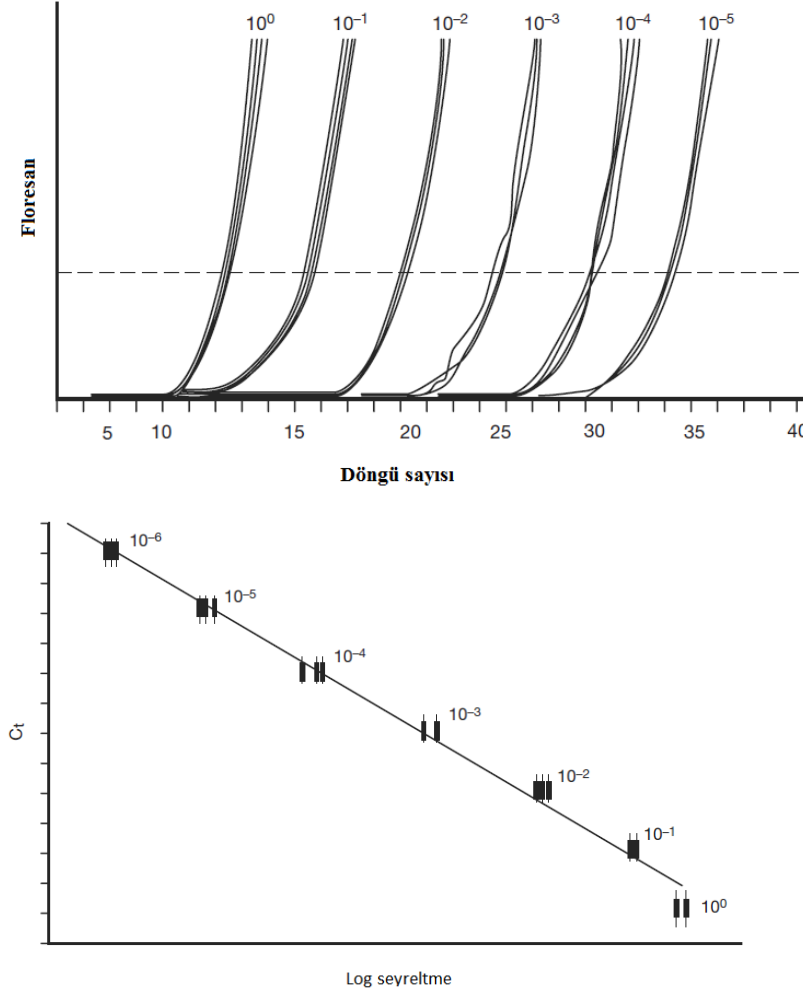
1.2.2. Kantitatif Verilerin Analizi

Kantitatif verilerin analizinde iki farklı yöntem uygulanmaktadır. Bu yöntemlerden ilki absolute (mutlak) veya standart, diğeri ise relatif (karşılaştırmalı veya göreceli) kantifikasyon olmaktadır (Arya ve ark., 2005).

1.2.2.1. Absolute (Mutlak) Kantitasyon

Bu yöntemde kalıp DNA miktarı bilinen standart örneklerle ait Ct değerleri ile miktarı bilinmeyen örneğin Ct değeri karşılaştırılarak kantitasyon yapılmaktadır. Bu nedenle, kantitatif PCR analizlerinde standart olarak tanımlanan kontrol örneklerine ihtiyaç vardır. Standart örnek olarak içinde bulunan kalıp DNA miktarı bilinen

örneklerle yapılan çalışmalara mutlak kantitasyon adı verilir (Yüzbaşıoğlu, 2008). Mutlak kantitasyon ile ilgili değerlendirme Şekil 1.6.'de verilmiştir.



Şekil 1.6. PCR amplifikasyon eğrisi ve standart eğri. Standart dilüsyon örneklerinin amplifikasyon eğrisi (üstte). Standart örneklerin Ct değerleri kullanılarak çizilen standart eğri gösterilmiştir (altta) (Ponchel, 2006)

1.2.2.2. Relatif (Karşılaştırmalı veya Göreceli) Kantitasyon

Göreceli veya karşılaştırmalı kantitasyon mRNA ifade düzeylerindeki oransal değişimleri ölçmektedir. Birden fazla örnek arasında bir genin kararlı mRNA düzeylerindeki değişimleri belirlemektedir. Göreceli kantitasyonda konsantrasyonu bilinen kalibrasyon eğrisi veya standartlara ihtiyaç duyulmamaktadır. Bunların yerine

referans olarak dizisi bilinen herhangi bir transkript olabilmektedir. Gen ifade düzeyindeki küçük fizyolojik değişimleri belirlemeye yarayan bir yöntemdir. Sürekli olarak ifade olan referans genler, referans olarak seçilmektedir. Bu genlere housekeeping gene (HKG) denmektedir. İfade düzeylerini belirlemede eşik eğrisi döngü noktasındaki farklılıklar kullanılarak ölçümler yapılabilmektedir (Pfaffl, 2006). Livak and Schmittgen (2001)'e göre hedef gen ile referans gen arasında karşılaştırma hesapları yapılabilmektedir.

1.2.3. Housekeeping Genler ve Normalizasyon

Real time kantitatif PCR deneylerinde spesifik hatalar; başlangıç RNA miktarında, RNA'nın kalitesinde, cDNA sentez aşamasında veya PCR amplifikasyonundaki küçük farklılıklardan dolayı olabilmektedir. Bu hataları azaltmak ve örnekler arasındaki farklılıkları düzeltmek için normalizasyon yapılması gerekmektedir. Bu amaçla çeşitli koşullar altında ifade düzeyinin değişmediği bilinen veya en az etkilenen bir referans gene ihtiyaç duyulmaktadır. Hedef genin ifade düzeyi, referasn gen olarak kullanılan housekeeping genin ifade düzeyi ile karşılaştırılmaktadır. Farklı doku ve hücre tiplerinde hedef genlerin ifade düzeyinin kantitatif olarak belirlenmesi için housekeeping genlerin doğru seçilmesi gerekmektedir (Arya ve ark., 2005; Pfaffl, 2006; Yüzbaşıoğlu, 2008).

1.3. Tek Nükleotid Farklılığı (SNP) ve Tespit Edilmesi

Tek Nükleotid Farklılığı, organizmalar arasında homolog bölgelerdeki tek bir nükleotidde meydana gelen değişimlere denilmektedir. Yani tek nükleotid farklılığı DNA dizisindeki varyasyonlara verilen isimdir. SNP'ler eş baskın, allelik ve polimorfiktirler (Auerbach, 2006; Ateş Sönmezoğlu ve ark., 2010; Singhal ve ark., 2011).

DNA markörleri; sekanslamaya dayalı, hibridizasyona dayalı ve PCR'a dayalı olmak üzere 3 farklı yöntemle tespit edilmektedir. Hibridizasyona dayalı metotta DNA kesim enzimleri ile kesilmektedir. Bu şekilde uygulanan yöntemle RFLP denilmektedir. PCR'a dayalı metotta ise DNA dizi bilgisine ihtiyaç duyulmadan yapılan yöntemdir. Bu yöntemde farklı olarak uygulanan işaretleme sistemleri bulunmaktadır. Bunlar RAPD, SSR, CAPS, AFLP gibi yöntemlerdir. Son olarak DNA dizi bilgisi gerektiren yöntem olarak SNP'ler kullanılmaktadır. Son yıllarda teknolojinin gelişmesine paralel ortaya çıkan mikroarray analizleriyle ifade olmuş diziler (EST) tespit edilmiştir. EST'ler kullanılarak haritalar meydana getirilmiştir ve bunlara EST haritaları denilmektedir (Jehan ve Lakhanpaul, 2006).

SNP'ler transversiyonlar (pürin bazının pirimidin bazı ile yer değiştirmesi veya tersi) ve transisyonlar (pürin bazının diğer pürin bazıyla (A ve G) veya pirimidin bazının diğer pirimidin bazıyla (C ve T) değişmesi) şeklinde ortaya çıkmaktadır. Transversiyonun farklı biçimlerinin sayısı (varyantlarının sayısı) transisyonun sayısının iki katından fazla olduğu halde, transisyon sıklığı (1,5 – 2,5 faktörü) transversiyonun sıklığından daha yüksektir. G>A ve C>T transisyonları, insan genomundaki SNP'lerin % 25'ini oluşturmaktadır. Tek nükleotid pozisyonundaki varyasyon terminolojisi allel frekansı ile açıklanmaktadır. Bir popülasyondaki tek baz değişiminin frekansı % 1'den büyük ise bu değişim SNP, % 1'den küçük ise mutasyon olarak adlandırılır (Ateş Sönmezoğlu ve ark., 2010; Anonim, 2013f).

SNP'ler gen içerisindeki bulunduğu yere göre sınıflandırılmaktadır. Buna göre; intron bölgeleri ve genin kodlanmayan bölgeleri (iSNP = intergenik SNP), amino asit dizilişine etki eden ve proteini dizisini değiştiren farklılık oluşturan (non sinonim) SNP'ler ve amino asit dizilişine etki etmeyen anonim SNP'lerdir (Singhal ve ark., 2011).

Başlangıçta SNP'ler klasik laboratuvar teknikleri ile belirlenebiliyordu. Fakat kademeli olarak gelişen biyoinformatik sayesinde Polybayes, SNPhunter, HaploSNPer gibi araçlar kullanılarak in silico olarak tespit edilebilmektedir. Bu in silico araçlar EST veri tabanlarını kullanarak SNP'leri belirlemektedir. Bu araçlar fonksiyonel genomik, farmakogenetik ve zirai çalışmalarda faydalı olmaktadır (Singhal ve ark., 2011). İn silico yöntemlerle belirlenen SNP'lerin laboratuvar ortamında test edilmesi gerekmektedir (Auerbach, 2006).

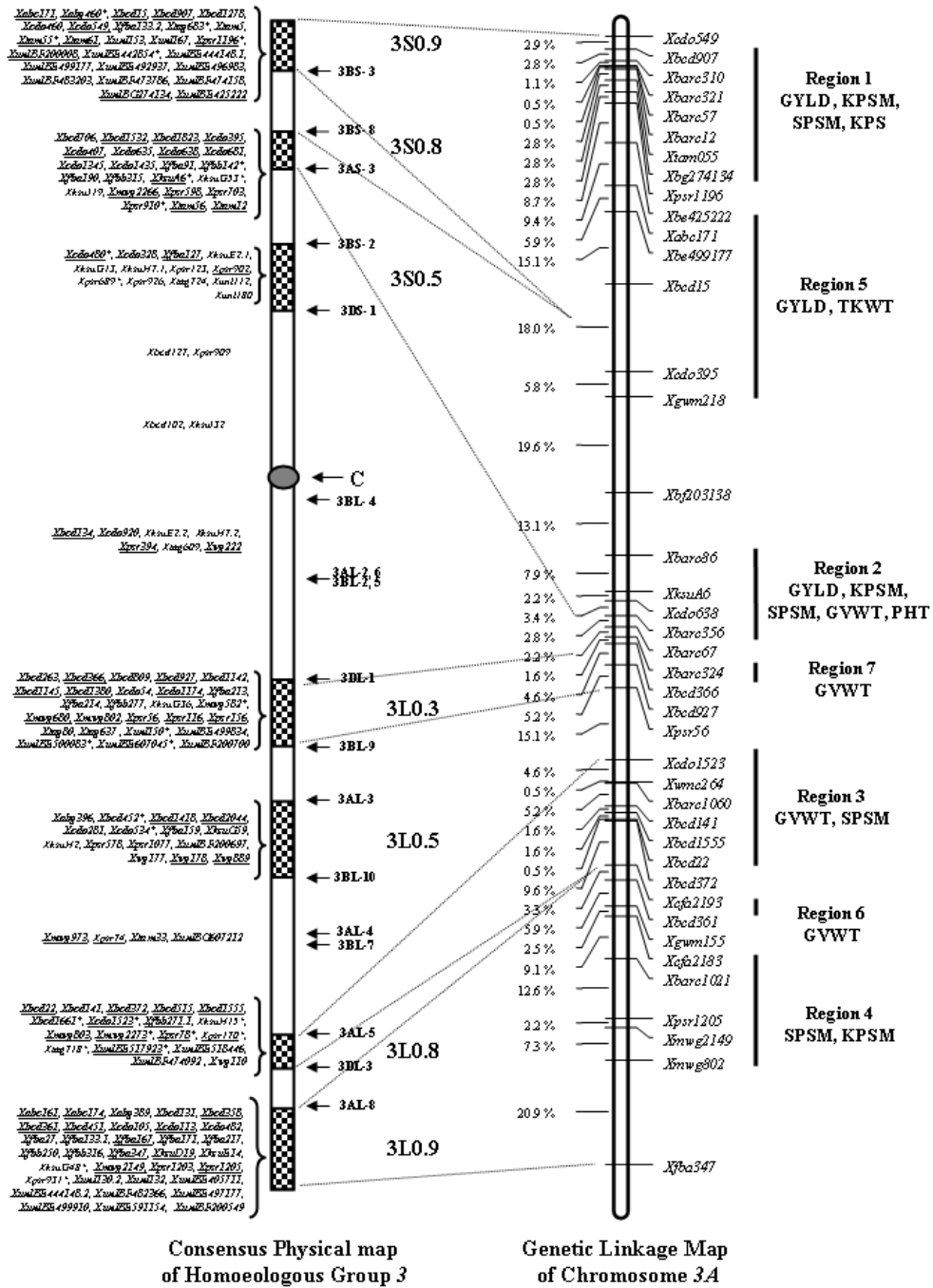
Detaylı biyoinformatik çalışmalar sonucunda Kawaura ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada buğdaydan elde ettikleri cDNA dizilerinden GenBank ID AK336220 kodlu gen parçasının *fw2.2* ile daha fazla homoloji oluşturduğu görülmüştür. Fakat bu gen ortoloğunun buğdayda çalışma mekanizmasına dair literatürde bir veri mevcut değildir. Bu çalışmada; biyoinformatik çalışmalar sonucunda domateste verim artışı sağlayan *fw2.2* genine benzerlik gösteren buğday ortoloğunun (AK326220) varlığının tespit edilmesi, bunların dizi analizleri ve tek nükleotid polimorfizm potansiyellerinin ve değişik tür ve çeşitlerde farklı ifade düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Buğday Verim Gen Bölgelerinin Analizi

Dane verimi belki de klasik ıslah metotları ile her zaman çalışılmış, ancak genetiği çok az anlaşılmış bir karakterdir. Ancak moleküler düzeyde buğday dane verimi mekanizmasını anlamaya yönelik çok az sayıda çalışma bulunmaktadır.

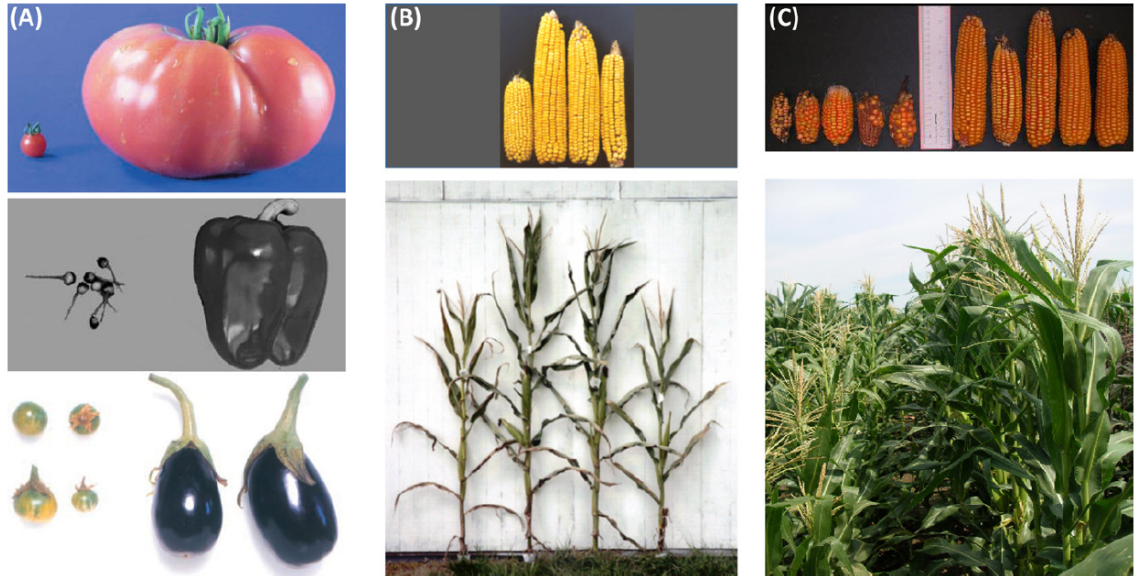
Buğdayda dane veriminin, 1000 dane ağırlığı, başaktaki başakçık sayısı, başakçıktaki dane sayısı ve birim alandaki başak sayısı gibi birçok karakterin karmaşık fonksiyonların bileşkesi olarak ortaya çıktığı bilinmektedir (Shah ve ark, 1999; Campbell ve ark, 2003). Yapılan çalışmalar ile buğday verim bileşenlerinin, erkencilik geni ile birlikte buğdayda 3A kromozomu üzerinde bulundukları ve birim alandan alınan buğday veriminin % 15 – 21 oranında etkiledikleri saptanmıştır (Shah ve ark, 1999). Yine 15 farklı bölgede yapılan tarla çalışmalarının kromozom 3A spesifik markörlerin verileri ile birleştirilmesi sonucu elde edilen genetik harita verim bileşeni QTL'lerinin genetik bölgeleri belirlenmiştir. QTL'lerin sınır markörlerin fiziksel olarak haritalanması ile de bu bileşenler buğday 3A kromozomunun % 36'lık bir kısmında bulunduğu saptanmıştır (Dilbirliği ve ark, 2006). Dolayısı ile buğdayda birden fazla da olsa dane verimini etkileyen gen bölgelerinin bulunduğu belirlenmiş, ancak bu gen bölgelerinin (QTL) detaylı yapıları ve sekanslarını belirlemek mümkün olmamıştır (Şekil 2.1.). Elde edilen buğday verim QTL'lerin her birinin yalnızca bir gen ile ifade edilebileceğine dair önemli bilgiler domates bitkisinde yapılan bir çalışma ile desteklenmektedir (Frary ve ark, 2000). Domates bitkisinde verimi direk olarak etkileyen ve meyve büyüklüğünü % 30 oranında kontrol eden *fw2.2* bölgesi önce bir QTL olarak tanımlanmış ve yapılan detaylı çalışmalar bu QTL'in aslında tek bir gen ile ifade edildiğini ortaya koymuştur (Frary ve ark, 2000).



Şekil 2.1. Buğday Verim Bileşenlerinin Kıyaslamalı (Fiziksel ve Genetik) Haritaları. GYLD (dane verimi), TKWT (1000 dane ağırlığı), KPS (başaktaki dane sayısı), SPSM (metre karedeki başak sayısı), KPSM (metrekaredeki dane sayısı), AD (çiçeklenme zamanı), PHT (bitki boyu) ve GVWT (dane ağırlığı) parametrelerini ifade etmektedir (Dilbirliği ve ark, 2006)

2.2. Domates fw2.2 Verim Geninin Özellikleri

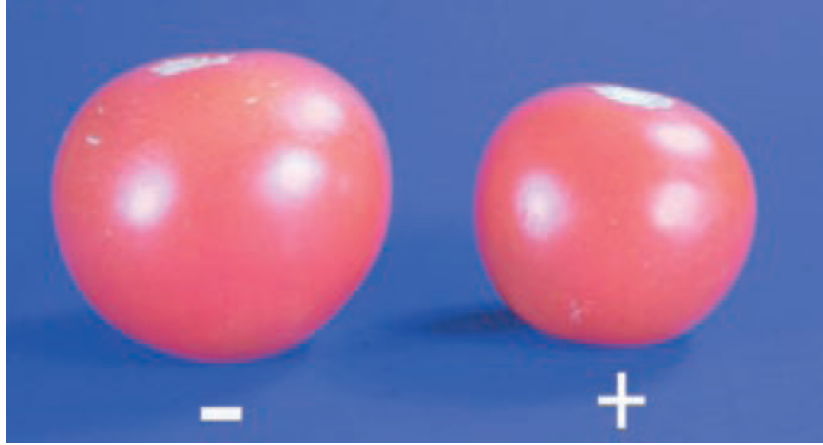
Domatesin yabani türü olan *L. pimpinellifolium*'da meyve büyüklüğü 1 cm³ kadar ve birkaç gramdan oluşmasına rağmen, günümüz kültür domates türü *L. esculentum*'da bir meyvenin büyüklüğü 1 kg'dan daha fazla olabilmektedir (Şekil 2.2.). Bu farklılığın nedenleri olarak ise domates meyve büyüklüğünü % 30 etkileyen fw2.2 QTL bölgesi belirlenmiştir. İlk başlarda bu bölgede birden fazla genin meyve büyüklüğünü etkilediği düşünülürken, bölgenin detaylı olarak incelenmesi, 3500'e yakın birey kullanılarak haritalanması ve markörler ile zenginleştirilmesi ile aslında % 30 etkinin bir gen tarafından kontrol edildiği saptanmıştır. Bu gen, çiçeklerin karpel (ovaryum, stil ve stigma) hücrelerini büyütmede ve dolayısı ile meyve büyüklüğüne etki etmektedir (Alpert ve Tanksley, 1996).



Şekil 2.2. Çeşitli türlere ait bitkilerin meyve ve bitki büyüklükleri. (A) En üstte; domates yabani ve kültür türleri (en üstte), orta kısımda; yabani biber türü *Capsicum annuum* cv. Chiltepin (solda) ve dolmalık biber (sağda), altta; yabani patlıcan türü *Solanum linnaeanum* MM195 (solda) and *S. melongena* MM738 (sağda). (B) Mısır heterosisi. Üstte; mısır koçanları, altta; mısır resiprokal melez çaprazları. (C) Aşırı ifade olan transgenik ZmCNR1: Üstte; mısır koçanları ve altta; transgenik bitkiler (solda), transgenik olmayan kontrol bitkileri (sağda) (Gou ve Simmons, 2011)

Domates fw2.2 geni hem *L. pimpinellifolium* ve hem de *L. esculentum* türlerinden kopya edilmiş ve sekanslanmıştır. Şaşırtıcı bir şekilde, analizler fw2.2 geninin her iki türde de DNA ve protein sekanslarının özdeş olduğu, yani hiçbir farklılık

olmadığı gözlenmiştir (Frary ve ark., 2000). Buna göre meyve büyüklüğü, genin direk olarak sekansından değil, genin ekspresyonunu kontrol eden üst-gen bölgesi (upstream) tarafından kontrol edilmektedir. Bu durum *L. pimpinellifolium*'a ait bir kozmidin komplementasyon çalışmasında *L. esculentum*'a aktarılması ile ispatlanmıştır (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. *L. esculentum* meyvelerinde *fw2.2* transgeninin fenotipik etkisi. (-) transgen içermeyen ve (+) *L. pimpinellifolium fw2.2* kozmidi içeren meyve

Avakado bitkisinde meyve hücre bölünmesini düzenleyen moleküler mekanizma araştırılmıştır. Hücre çoğaltmayla ilgili dört gen ve küçük meyve ve normal meyve fenotipleri üzerinde bu genlerin ifade düzeyleri belirlenmiştir. Mitotik siklinler *PaCYCA1* ve *PaCYCB1* ve çoğalan hücre nükleer antijeni (*PaPCNA*) normal meyve büyüklüğü fenotipinden elde edilmiştir. Bu üç transkript genç normal meyvenin mitoz bölünmenin en fazla görüldüğü yapraklarda, köklerde ve genç meyveciklerde tespit edilmiştir. Buna karşın küçük meyve fenotipinde domatesteki meyve büyüklüğü genine benzer bir gen tespit edilmiştir. Ayrıca aynı dokular üzerinde yapılan çalışmada *Pafw2.2* benzeri mRNA birikimi küçük meyve fenotipinde normal meyve fenotipine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Dahan ve ark., 2010).

Mısır bitkisinde heterosis'in (melez azmanlığı) tespit edilebilmesi için hücre sayısının kontrolü üzerinde durulmuştur. Bu amaçla diğer bitkilerde tespit edilen ve mısırdaki da domates *fw2.2* genine benzer bir gen ailesi belirlenmiştir. Hücre sayısı düzenleyicileri (*CNR*) olarak bilinen bu aile 13 üyeden oluşmaktadır. Bu 13 üyenin sadece 2 tanesi (*CNR1* ve *CNR2*) domates *fw2.2* genine ortologudur. *CNR1* ve *CNR2* bitkilere aktarıldığında, *CNR1* bitki direncini negatif olarak etkilemiştir. Buna karşın

CNR2 geni bitki büyümesi üzerine bir etkisinin var olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu genin susturulması ile yine benzer sonuçlar elde edilmiştir (Gou ve ark., 2010).

Ökaryotlarda *PLAC8* ve *fw2.2* benzeri genlerin değerlendirilmesi üzerine yapılan bir çalışmada memeli plasental proteinlerinde *PLAC8* bölgesi tespit edilmiştir. Bu çalışmada bitki *fw* benzeri gen ailesi ve *PLCA8* bölgesine sahip olan proteinlerin ailesi hücre bölünmesi ve organogenesisi kontrol eden hücre düzenleme mekanizmasının birer bileşeni olduğu belirtilmiştir. Hem *fw2.2* hem de *PLAC8* bölgesi benzer protein dizilerine sahip olduğu ve benzerliğin bu proteinlerin biyokimyasal fonksiyonlarını açıklamada yararlı olacağı bildirilmiştir (Libault ve Stacey, 2010).

Soya fasulyesi ile yapılan bir çalışmada ise domates *fw2.2* geninin bir ortologu tespit edilmiştir. Bu çalışmada ortolog *GmFWL1* geni, nodül oluşumunda rol oynamaktadır. *GmFWL1* ifadesi azot fikse eden *Bradyrhizobium japonicum* bakterisinin inokülasyonu ile başlatılmaktadır. Bu işlem nodül taslağını başlatan bitki kabuk hücre bölünmesinin tetiklenmesine yol açmaktadır. Özellikle *GmFWL1* nodulasyonun meydana geldiği kök tüyü hücrelerinde başlatılır. *GmFWL1*'nin RNAi ile susturulması sonucunda nodul sayısında önemli bir azalış meydana geldiği bildirilmiştir (Libault ve ark., 2010).

Blas ve ark. (2010) Papaya bitkisinde meyve büyüklüğü ve şeklini kontrol eden kromozom bölgesinin tespit edilmesi çalışmasında 6 QTL belirlemiştir. Bu QTL grupları meyve büyüklüğü ve şeklini düzenleyen domates QTL *ovate*, *sun* ve *fw2.2*'nin homologlarını içermektedir. Ayrıca yapılan bu çalışmada aday genler tespit edilmiştir. LG09 üzerinde *L. esculentum fw2.2* (GenBank ID: AAO12188.1) protein dizisinin ortolog bölgesi tespit edilmiştir.

Franceschi ve ark. (2013) vişne ve kiraz'dan oluşan *Prunus* türlerindeki meyve büyüklüğünü kontrol eden aday genlerin tespiti çalışmalarında domates ve mısırdaki hücre sayısını ve organ büyüklüğünü düzenleyen *fw2.2/CNR* genlerine benzer 23 *fw2.2/CNR* ailesinin üyesini tespit etmişlerdir. Bu *CNR* ailesinin 2 üyesinin OTL'leri *Prunus avium* (kiraz)'da tespit edilen ve PavCNR12 ve PavCNR20 olarak isimlendirilen bağlantı grubu 2 ve 6 üzerinde belirlenmiştir. Kiraz'da yapılan çalışmalar sonucunda bağlantı grubu 2 meyve büyüklüğü QTL'i üzerinde bulunan PavCNR12'nin önemli bir role sahip olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca bulunan bu QTL'in diğer *Prunus* türü olan

vişnede de muhtemelen olabileceği belirtilmiştir. Yine bu QTL'in markör destekli seleksiyonda kullanılabileceği önerilmiştir.

Buğday bitkisinde tohum dane ağırlığından sorumlu olan çeltik ortolog geni *TaGW2* ile yapılan bir çalışmada, *TaGW2* geni buğdayın 6. Kromozomu üzerinde tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmanın sonuçlarına göre *TaGW2* geninin 8 ekzonunda T (timin) bazı insersiyonu bulunmuştur. Bu insersiyon normalde oluşması gereken 482 amino asit yerine 328 amino asit oluşmasına sebep olmaktadır. Değişme sebep olan allellerde allele özgü markör geliştirilmiştir (Yang ve ark., 2012).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyalinin Elde Edilmesi

Çalışmada kullanılan bitkiler Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünden temin edilmiştir. Kontrol olarak uluslararası alanda verimsiz varyete olarak bilinen ve aynı anda veri tabanındaki EST sekanslarının büyük çoğunluğunun elde edildiği *Chinese spring* varyetesi RNA izolasyonu için kullanılmıştır. Ayrıca hedef gen için varyasyonu oluşturmak amacıyla buğday A (*Triticum urartu*), B (*Aegilops speltoides*) ve D (*Aegilops tauschii*) genomu donörleri ile ülkemizde yetiştirilen değişik verim değerlerine sahip buğday çeşitleri analizlerde kullanılmıştır. Bu çeşitler arasında kışlık, yazlık, alternatif, ekmeklik (kırmızı, kırmızı sert, beyaz sert vb.) ve makarnalık buğday çeşitleri bulunmaktadır. Yaklaşık 120 kadar çeşit arasından verim açısından değişkenlik gösteren 23 çeşit seçilmiştir. Seçilen çeşitler verim açısından kuru şartlarda 114 kg/da ve 681 kg/da arasında değişiklik göstermektedir. Ayrıca seçilen çeşitler iki yıl (kuraklık yaşanmayan 2005 ve 2006) üst üste benzer verim düzeyi gösterenler (yüksek stabilite) ve aşırı verim farkı (düşük stabilite) da göstermektedir. Böylece fenotipik özellikler açısından farklılıkları bulunan çeşitler yanında verim bakımından genotipik farklılık gösterenlerin de seçilmesi hedef gen bakımından varyasyon gösteren bir popülasyon oluşturulmasını sağlamıştır. Araştırmada kullanılacak olan çeşitler ile ilgili genel bilgiler Çizelge 3.1. ve Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan buğday çeşitleri

ÇEŞİTLER 1, 2, 3	2005 VERİM (kg/da)	2006 VERİM (kg/da) 4	ORTALAMA VERİM (kg/da)	ÖZELLİK	ISLAHÇI KURUM
ZİYABEY - 98	668	681 (+13)	675	Ekmeklik	ETAE
BASRİBEY - 95	612	582 (-30)	597	Ekmeklik	ETAE
GÖNEN	488	451 (-37)	470	Ekmeklik	ETAE
PEHLİVAN	418	405 (-13)	411	Ekmeklik	TİGEM
KAŞİFBEY - 95	369	391 (+22)	380	Ekmeklik	ÇTAE
KATE - A - 1	450	335 (-115)	393	Ekmeklik	ATAE

Çizelge 3.1. (Devamı) Çalışmada kullanılan buğday çeşitleri

ÇEŞİTLER 1, 2, 3	2005 VERİM (kg/da)	2006 VERİM (kg/da) 4	ORTALAMA VERİM (kg/da)	ÖZELLİK	ISLAHÇI KURUM
SULTAN - 95	490	400 (-90)	445	Ekmeklik	TBMAE
GEREK - 79	279	272 (-7)	275	Ekmeklik	ATAE
GÜN - 91	250	274 (+24)	262	Ekmeklik	TBMAE
BEZOSTOYA - 1	255	264 (+9)	260	Ekmeklik	ATAE
PANDAS	230	266 (+26)	248	Ekmeklik	ÇTAE
GUADALAUPE	595	508 (-87)	551	Ekmeklik	TİGEM
CUMHURİYET - 75	331	310 (-21)	320	Ekmeklik	ETAE
BAYRAKTAR	245	214 (-31)	230	Ekmeklik	TBMAE
İKİZCE - 96	196	224 (+30)	210	Ekmeklik	TBMAE
KIRAÇ - 66	185	233 (+48)	209	Ekmeklik	ATAE
Ç - 1252	173	428 (+255)	301	Makarnalık	TBMAE
KUNDURU - 1149	114	334 (+220)	224	Makarnalık	ATAE
AYDIN - 93	457	521 (+64)	489	Makarnalık	ATAE
KIZILTAN - 91	175	293 (+118)	234	Makarnalık	TBMAE
ANKARA - 98	186	294 (+108)	240	Makarnalık	TBMAE
FIRAT - 93	300	297 (-3)	298	Makarnalık	GDТАЕ
SARIÇANAK - 98	468	334 (-134)	401	Makarnalık	ÇTAE

¹ Çeşit verim bilgileri Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü'nden (TİGEM) sağlanmıştır.

² Çeşit verimleri 3,776 ile 151,984 dekar arasında değişen ekim alanları üzerinden hesaplanmıştır.

³ Çeşitlerin verim ortalamaları en az 2, en fazla 8 ayrı işletme verisinden hesaplanmıştır.

⁴ Parantez içindeki rakamlar 2006 yılı verim değerlerinin 2005 yılındaki verim değerlerinden farkıdır.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan buğday ata türlerinin menşeleri

Takson	Bitki ID	Toplandığı bölge
<i>Aegilops speltoides</i> var. <i>speltoides</i>	84TK098-021A	Türkiye, Diyarbakır
<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>dicoccon</i>		İspanya, Zaragoza
<i>Triticum monococcum</i> subsp. <i>monococcum</i>	G2900	Türkiye, Manisa
<i>Triticum urartu</i>	G1820	Türkiye, Mardin

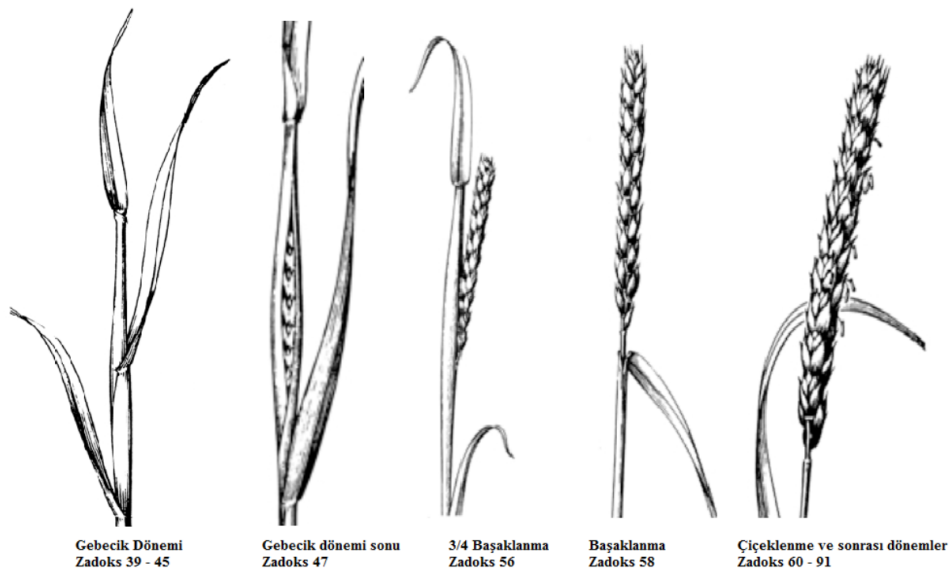
3.2. Bitkilerin Yetiştirilmesi, DNA ve RNA İçin Örneklerin Alınması

Bitkiler iki lokasyonda sırasıyla tarla ve tel kafes şartlarında Mustafa Kemal Üniversitesi Telkalis Araştırma ve Uygulama Tarlası (36°15'13.85"K, 36°30'8.18"D) ve Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi (36°19'30.96"K, 36°11'44.22"D) bölgelerinde yetiştirilmiştir. Tarla şartlarında iki sıra halinde sıra arası 20 cm, sıra uzunluğu 2 m olacak şekilde elle ekim yapılmıştır (Şekil 3.1). Sera şartlarında ise 3 lt lik saksılar kullanılarak 2:1:1 oranında sırasıyla tarla toprağı (elenmiş): torf: kum şeklinde

karışımlara 5 tekerrürlü olarak ekilmiştir. Projede adı geçen *Chinese spring* buğdayı ile buğdayın yabani akrabaları olan *Aegilops speltoides*, *Triticum urartu* ve *Triticum tauschii* sadece sera şartlarında 5 tekerrürlü olarak saksılara ekilmiştir. Örneklemeler Zadoks ölçeğine (Zadoks ve ark., 1974) göre Şekil 3.2.'de belirtildiği şekilde buğday gelişim dönemlerinde alınmıştır. Buna göre örnek alımları her çeşit veya türe ait başak ve yapraklardan bitki örnekleri 48 saat aralıklarla alınıp sıvı azota bırakılmış daha sonra -80°C de analiz anına kadar bekletilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan bitkilerin tarlada görünümü



Şekil 3.2. Buğday gelişim dönemleri ve Zadoks ölçeği (Anonymous, 2013e)

3.3. Toplam RNA İzolasyonu ve Saflaştırma

Araştırma kapsamında yer alan bitki materyallerine ait başaklardan ayrı ayrı RNA izolasyonları yapılmıştır. Bu kapsamda beş dönem için iki lokasyonda alınan örnekler sıvı azot içinde öğütülerek (260 örnek) RNA izolasyonu için hazır hale getirilerek -84 °C de izolasyon anına kadar muhafaza edilmiştir. Daha sonra aynı tür veya çeşide ait olan fakat farklı dönemlerde alınan başaklara ait örnekler birleştirilmiştir. Böylelikle 26 örneğe ait RNA izole edilerek gen ifadesi analizine tabi tutulmuştur. RNA izolasyonu EZ-RNA Total RNA izolasyon Kiti (Biological Industries, İsrail) kullanılarak, kit protokolü doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. RNA çalışmalarında ön koşul, RNA yapısının korunmuş biçimde parçalanmadan izole edilmesidir. RNA parçalanmasına sebep olan en büyük etken ribonükleaz (RNaz) bulaşmasıdır. Çok az miktarda RNaz bulaşması dahi sağlam RNA izolasyonunu engellemektedir. RNA izolasyonu aşamasında ortama RNaz bulaşmasını önlemek için denemede kullanılan bütün plastik malzemeler ile gerekli tüm çözeltiler, RNaz aktivitesini engelleyen dietilpirokarbonat (DEPC) ile muamele edilmiştir. DEPC muamelesine ilave olarak malzemeler, 121 °C ve 0,1 MPa basınçta 15 dakika otoklavlandıktan sonra 105 °C’de en az gece boyu bekletilmiştir. Havan ve havan kolları ise 300 °C’de gece boyu bekletilmiştir. RNA izolasyonu için RNaz ve DNaz ari filtreli pipet uçları kullanılmıştır. RNA izolasyonunda kullanılan pipetler ve RNA izolasyonun yapıldığı tezgahın üzeri, RNaz bulaşmasını engellemek için %30’luk H₂O₂ ile temizlenmiştir.

3.4. RNA İzolasyon Hazırlıkları

DEPC-dH₂O hazırlanması: Ultra saf suya % 0,1 oranında DEPC ilave edilmiş ve DEPC tam çözünene kadar karıştırılmıştır. DEPC uygulanmış su, oda sıcaklığında gece boyu bekletilmiş ve ardından otoklavlanarak steril edilmiştir.

Pipet uçlarının kullanıma hazırlanması: RNaz ve DNaz ari filtreli pipet uçları dışındaki diğer pipet uçları % 0,1'lik (v/v) DEPC çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında gece boyu bekletilmiştir. Ardından pipet uçları 20 dakika otoklavlanmış ve 105 °C'de bekletilerek kurutulmuştur.

Porselen havan ile havan kolunun kullanıma hazırlanması: Havan ve havan kolu, alüminyum kâğıt ile sarılmış ve 300 °C'de gece boyu bekletilmiştir.

RNA elektroforezinde kullanılacak tankların hazırlanması: Elektroforez tankları deterjanlı su ile yıkandıktan sonra destile su ile durulanmıştır. Tankların içine % 3'lük (w/v) H₂O₂ çözeltisi doldurulmuş ve oda sıcaklığında en az 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra, tanklar % 0,1'lik (v/v) DEPC'li distile su ile durulanmıştır.

3.5. RNA İzolasyonu

Toplam RNA izolasyonu; EZ-RNA Total RNA izolasyon Kiti (Biological Industries, İsrail) kullanılarak, üreticinin talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. İzolasyon aşamaları aşağıda verildiği gibi yapılmıştır.

- 1) Daha önce havanda öğütülen örnekler yaklaşık 100 mg doku gelecek şekilde eppendorf tüplerine tartılarak alınmıştır.
- 2) Denatürasyon solüsyonundan eppendorf tüplerine 0,5 mL bırakılmıştır.
- 3) 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- 4) 0,5 ml ekstraksiyon solüsyonu eklenerek hızlı bir şekilde 15 s elle çalkalanmıştır. 10 dakika oda sıcaklığında beklemeye bırakılmıştır.
- 5) 12000g'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
- 6) En üstteki faz temiz bir eppendorf tüpe alınmıştır.
- 7) RNA'yı çöktürmek için 0,5 ml izopropanol eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- 8) 12000g'de 4°C'de 8 dakika santrifüj edilmiştir.
- 9) Süpernatant uzaklaştırılır ve RNA peletine 1 ml %75 EtOH eklenerek vorteks yardımıyla yıkanmıştır.

- 10) 7500g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- 11) EtOH uzaklaştırılır ve 5 dakika hava kurutması yapılmıştır.
- 12) RNA peleti 100 µl DEPC muameleli su ile çözündürülmüştür.
- 13) Solüsyon 10 – 15 dakika 55°C'de bekletilmiştir.
- 14) $A_{260/280}$ O.D. değerinde RNA örnekleri 1.6 - 1.9 değerlerine sahip olmuştur.

3.6. RNA Konsantrasyonlarının Tespit Edilmesi

Toplam RNA konsantrasyonları ACTGene Spektrofotometre (ACTGene UVIS-99, NJ, USA) ölçümleri yapılarak $A_{260/280}$ O.D. değerindeki veriler alınmıştır (Çizelge 3.6.1.). Bu sonuçlara göre tüm örneklerin toplam RNA'ları 0,5 µg olacak şekilde ayarlanarak jel üzerinde gözlemlenmiştir (Şekil 3.3.).

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan genotiplere ait nanodrop ölçümleri

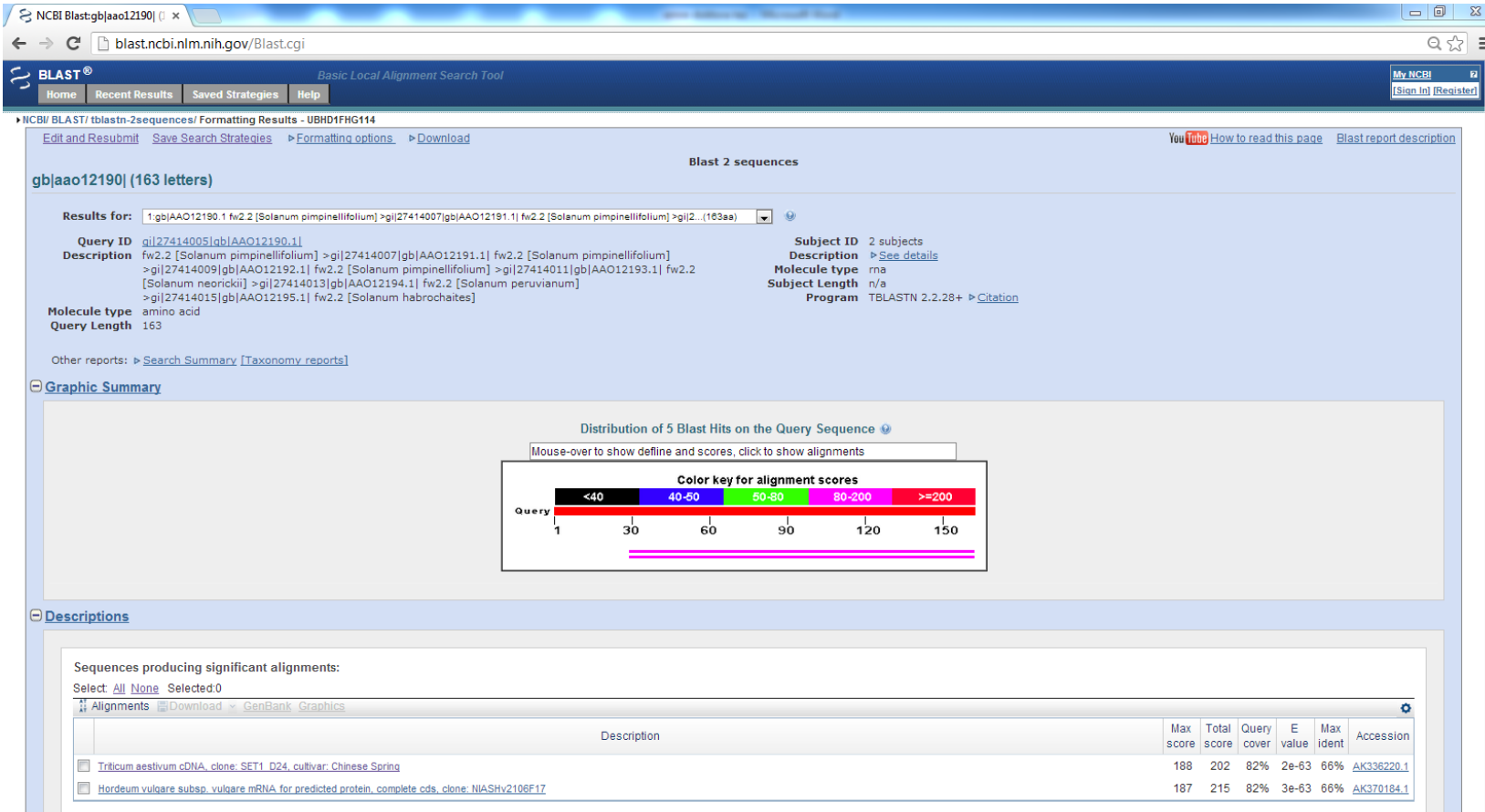
Genotip	$A_{260/280}$	Konsantrasyon(ng/ul)
<i>Ae. tauschii</i>	1,84	643
Ankara - 98	1,74	187,7
Aydın - 93	1,75	425,7
Basribey - 95	1,7	411
Bayraktar - 2000	1,88	670
Bezostaya – 1	1,76	288,2
<i>C. spring</i>	1,66	284,8
Cumhuriyet - 75	1,69	258,5
Ç-1252	1,78	285,8
Fırat - 93	1,6	314,3
Gerek - 79	1,71	329,7
Gönen - 98	1,82	300,8
Guadalupe	1,67	216,3
Gün – 91	1,4	74,9
İkizce - 96	1,81	915,4
Kaşıfbey - 95	1,73	917,9
Kate A-1	1,69	305,4
Kıraç - 66	1,72	265,2
Kızıltan - 91	1,71	316,6
Kunduru-1149	1,8	782,3
Pandas	1,67	200

Çizelge 3.3. (Devamı) Çalışmada kullanılan genotiplere ait nanodrop ölçümleri

Genotip	A260/280	Konsantrasyon(ng/ul)
Pehlivan	1,83	649,3
Sarıçanak - 98	1,74	631,4
Sultan - 95	1,71	270,3
<i>T.monococcum</i>	1,69	371,8
<i>T.speltoides</i>	1,73	335,6
<i>T.urartu</i>	1,76	119,5
Ziyabey - 98	1,72	221

3.7. Aday Gen Eldesi için Biyoinformatik Çalışmalar

Domates genomunda yapılan biyoinformatik çalışmalar ilgili veri tabanlarından yararlanılarak *fw2.2* genine ait yeni bilgiler aday gen için primer tasarımı için kullanılmıştır. *L. esculentum* (AAO12188) ve *L. pimpinellifolium* (AAO12190) protein sekansları kullanılarak yapılan TBLASTX ve TBLASTN veritabanı taramaları sonucunda buğday ve arpaya ait EST protein dizileri belirlenmiştir. Birinci aşamada, belirlenen protein dizileri arasından *L. esculentum* ve *L. pimpinellifolium* protein dizilerine en çok benzerlik gösterenler seçilerek “CLC Sequence Viewer” programı aracılığı ile ‘dizi hizalama’ (sequence alignment) yapılmıştır. Böylece tarama yapılan EST dizileri ile domates proteinlerinin ne oranda benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Yapılan hizalama Şekil 3.3.’de verilmiştir. İkinci aşamada ise domates proteinleri ile en yakın benzerlik gösteren 2 buğday ve arpa EST proteini arasından domates proteinlerine en yakın benzerliği gösteren dizi belirlenmiştir. Yüksek oranda benzerlik gösteren buğday dizilerinden ileri ve geri yönlerde primer tasarımı yapılmıştır.



Şekil 3.3. *L. esculentum* ve *L. pimpinellifolium* domates proteinlerinin buğday ve arpa EST tabanlarında yapılan taraması

3.8. Çalışmada Kullanılan Primerlerin Tasarımı

Domateste elde edilen *fw2.2* geninin buğdayda ortologu olarak tespit edilmiş GenBank ID: AK336220 cDNA klonunun farklı bölgelerinden Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) yardımıyla primerler tasarlanmıştır. Hedeflenen bölgenin üretilmesinde aşağıdaki primerler kullanılmıştır (Çizelge 3.4.).

fw2.2 cDNA Klonu Tüm Uzunluk (Full lenght) (AK336220) Dizisi

```

1  gaagtccaag gccatccacg gcacaaccgc caacgggtggt gggcagtttc gcttggctcc
61  tcctgtcttg tagtagttcg cgtgcacaag aggtcgccat gtacccgaag ccggaggatg
121 gtccggcgac gggcttcccg atgagcggcg gcacgggcgt aggcgttggc ggcggcggtg
181 gcccggggcg gtactaccag gcggcgccgg cgacagcggc gttcgcgatg caggcgcagg
241 cgccgctggc ggcgtggtcg acggggcgtgt ggcactgctt cgacgactgc ggcaactgct
301 gcatcacgtg cctgtgcccg tgcatacgt tcgggcagggt ggcggagatc atcgaccgcg
361 ggtcgacgtc gtgcggggcg agcggcgcg cctacgcgct catcatgctg ctcaccggct
421 gccagtgctg ctactcctgc ttctaccgct ccaagatgcg cgcgcactac ggctgcagg
481 agagcccctg cgccgactgc tgcatacact ggtgctgcga gccctgcgcg ctctgccagg
541 agtaccgcga gctcaagaa aggggcttcg acatgaacct cggatggcac gccaacatgg
601 agaggcaagg acgcactccg gcgaccatgc caccctcat gcaccaggg atgaccgctt
661 gatcgatctg tgcttttggt ctccaagaca cgtctaaagt gtgcgtcctt atgtagtaga
721 agaagtaatc tccatgctat tcggcgctt tgcggtgccg gtgttaccta ctttgcagg
781 ttctgtacaa tactgtgtaa cacacgacta ctactttgtg taatgttact gcaaacgtat
841 tttccctttt ttttatctag aatatgcatg agtatgcgta ttttatatta agaggagaag
901 aggataaggg caaaaaaaaa aaaaaaacg a

```

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan primerler

Primer	Forward Primer	Reverse Primer	Tm	PCR ürünü (bp)
fw22-156	CTGCCAGTGCCTCTACTCCT	ATGTCGAAGCCCCCTCTTCT	58.0	156
fw22-643	TGTGCGACTGCTTCGACGACTGC	CCCTTATCCTCTTCTCCTCTTAAT	54.7	642
β – Actin	ACCTTCAGTTGCCAGCAAT	CAGAGTCGAGACAATACCAGTTG	62.4	90

3.9. cDNA Sentezinin Yapılması

Ölçümleri yapılan toplam RNA'lar eşitlenerek Fermentas RevertAid First Strand cDNA sentez kitinin (#K1622) talimatları doğrultusunda yapılmıştır. cDNA sentez karışımının hazırlanması (Çizelge 3.5.).

Çizelge 3.5. cDNA sentez karışımı

Toplam RNA (0,5 µg/µl)	---
RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/µl)	1 µl
RiboLock RNase Inhibitor (20 u/µl)	1 µl
5X Reaction Buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT)	4 µl
10mM dNTP Mix	2 µl
Oligo(dT)18 Primer 100 µM, 0,5 µg/µl (15 A ₂₆₀ u/ml)	1 µl
Nükleaz free su	----
Toplam	20 µl

PCR cihazında 42°C'de 60 dakika inkübasyon yapılmıştır.

Sentez işlemini sonlandırmak için 70°C'de 5 dakika bekletilmiştir.

- 20°C'de saklanmıştır.

3.10. cDNA'ların β – Actin Geni ile Belirlenmesi

Sentezlenen cDNA'lar, β-actin (GenBank ID: AB181991.1) primerleri referans olarak kullanılarak PCR analizi ile kontrol edilmiştir. PCR bileşenleri ve amplifikasyon parametreleri aşağıda sunulmuştur.

PCR bileşenleri:

10X PCR Tamponu	2,00	µl
dNTP karışımı (her biri 1,0 mM)	2,00	µl
İleri primer (1,0 µM)	1,00	µl
Geri primer (1,0 µM)	1,00	µl
Taq polymeraz (50U/ µl)	0,60	µl
DEPC H ₂ O	12,40	µl
	19,00	µl
cDNA (1:200)	1,00	µl
Toplam	20,00	µl

Amplifikasyon parametreleri:

1. Başlangıç denaturasyonu	95 °C	5 dk	
2. Ayırma	94 °C	30 sn	
3. Bağlanma	52 °C	30 sn	[35 döngü]
4. Uzama	72 °C	1 dk	
5. Son uzama	72 °C	10 dk	

PCR ürünleri %1,2 agaroz jelde koşturularak analiz edilmiştir.

3.11. RT – PCR İle Gen İfade Analizi

Tüm real-time PCR örnekleri 3 tekerrürlü olarak koşturulmuştur. RT-PCR analizinde, 1:200 oranında seyreltilmiş cDNA'lar kalıp olarak kullanılmıştır. RT-PCR reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon sıcaklık döngüsüne ait program aşağıda verilmiştir. Tüm reaksiyonlar Bioneer Exicycler96[®] (Bioneer, South Korea) cihazında gerçekleştirilmiştir.

Real-Time PCR reaksiyon bileşenleri

Toplam Karışım	: 12,5 µl
İleri primer (2,5 µM)	: 1,2 µl
Geri primer (2,5 µM)	: 1,2 µl
Ultra saf su	: 8,1 µl
cDNA [1:200]	: 2,0 µl

Son Hacim	: 25,0 µl
-----------	-----------

Real-Time PCR programı

Hot Start	: 95 °C	10 dk	
Ayrışma	: 95 °C	15 s	
Bağlanma	: 55 °C	30 s	40 döngü
Uzama	: 72 °C	30 s	
Erime	: 50 °C'den 94 °C'ye 3 s/her bir sıcaklık		

3.12. DNA İzolasyonu ve DNA'nın Elde Edilmesi

DNA izolasyonu Shagai-Marooft ve ark. (1984) protokolündeki bazı değişikliklerle aşağıda belirtilen aşamalar halinde takip edilmiştir. İzolasyon tamponu 50 ml hazırlanmış ve 65°C ye kadar su banyosunda ısıtılarak içerisine 100 µl β-Mercaptoethanol [Merck ®] eklenmiştir. Örneklerin dokularından 0,05 g tartılarak 2,0 mL'lik eppendorfa bırakılmıştır. Sıvı azot kullanılarak tüplerin içinde bulunan yapraklar 1 ml'lik pipet ucu yardımıyla ezilerek öğütülmüştür. Öğütülmüş örnekler 600 µl izolasyon tampon çözeltisi eklenerek su banyosuna bırakılmıştır. Yaklaşık 60- 80 dakika inkübasyona tabi tutulan örnekler, her 15 dakikada bir alt üst edilerek karıştırılmıştır. Daha sonra örneklerin üzerine 600 µl kloroform: izoamilalkol (24:1) eklenip hafifçe alt üst edilerek karıştırılmıştır. Karışımı yapılan örnekler 10 dakika 5700 RPM'de santrifüj edilmiştir. Oluşan üç katmanın en üstteki katmanı (süpernatant) pipet yardımıyla alınarak yeni bir eppendorf tüpüne bırakılmıştır. Süpernatanta 600 µl isopropanol (-20 °C) ilave edilip hafifçe alt üst edilerek DNA peletinin oluşumu gözlenmiş daha sonra 10 dakika 5700 RPM'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp kâğıt havlu üzerinde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan örnekler 500 µl %70 EtOH eklenmiştir. Sekiz dakika 5700 RPM'de santrifüj edilip temizlenen DNA

çökeltiştir. Etanolün (EtOH) tüplerden DNA'dan tamamen uzaklaştırılması için tüpler temiz bir kâğıt havlu üzerine ters döndürülerek, 20 dakika süre bekletilmiştir. Sonra 300 µl TE tamponu eklenerek +4 °C' de bir gece bekletilmiştir. Beş dakika 5700 RPM'de santrifüj edilmiştir. Kirli olan DNA' yı temizlemek için her tüpe 200 µL 5M NaCl ve toplam hacim kadar %100 saf Etanol eklenip, tampon çözeltisi alt üst edilmiştir. Beş dakika 6000 RPM' de santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırılarak hava kurutması yapılmıştır. Daha sonra 200 µl steril saf su bırakılıp +4 °C'de 1 gün bekletilmiştir. Peletler saf su içerisinde tamamen eridikten sonra -20 °C'de depolanmıştır.

3.13. DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Elde edilen DNA'ların konsantrasyonu ACTGene Spektrofotometre (ACTGene UVIS-99, NJ, USA) ile belirlenmiştir. Her bir örneğin konsantrasyonu belirlendikten sonra tüm örneklerin son konsantrasyonu 10 ng/µL'ye ayarlanmıştır. Tüm genotiplere ait konsantrasyon ölçümleri Çizelge 3.6.'de verilmiştir.

Çizelge 3.6. Genotiplere ait DNA konsantrasyonları

Genotip	A _{260/280}	Konsantrasyon (ng/ µL)
<i>T. tauschii</i>	2,07	451,2
Ankara - 98	2,02	486
Aydın - 93	2,02	945,4
Basribey - 95	1,97	389,5
Bayraktar - 2000	2,07	827,1
Bezostaya – 1	2,02	371,5
<i>C. spring</i>	2,05	352,3
Cumhuriyet - 75	2,12	335,2
Ç-1252	2,06	366,8
Fırat - 93	1,97	491,6
Gerek - 79	2,05	432,1
Gönen - 98	2,07	190,2
Guadalupe	2,03	350,2
Gün - 91	2,01	491,6
İkizce - 96	1,99	474,9

Çizelge 3.6. (Devamı) Genotiplere ait DNA konsantrasyonları

Kunduru - 1149	2,07	402,9
Pandas	2	139
Pehlivan	2,04	806,1
Sarıçanak - 98	2,04	309,7
Kaşıfbey - 95	2,02	492,2
Kate A-1	2,04	470,8
Kıraç - 66	2,04	155,6
Kızıltan - 91	2,05	381,5
Sultan - 95	1,92	231,8
<i>T.monococcum</i>	2,09	769,4
<i>A.speltoides</i>	2,07	394,3
<i>T. turgidum</i>	2,04	448,3
<i>T.urartu</i>	2,08	382,5
Ziyabey - 98	1,98	415,5

3.14. PCR Çalışması

Projede sekans yapabilmek için genotiplerdeki AK336220 gen bölgesi üzerinde tasarlanan *fw2.2-643* kodlu primer ile PCR çalışması yapıldı. PCR çalışmasının aşamaları aşağıdaki gibidir. PCR ürünleri %2'lik agaroz jel üzerine alınmıştır.

PCR Karışımının Hazırlanması

Kalıp DNA (10ng/ µL)	: 3,0 µl
Primer L (1 µM/ µL)	: 1,0 µl
Primer R (1 µM/ µL)	: 1,0 µl
dNTP (1 mM/ µL)	: 2,0 µl
10X PCR Buffer	: 2,0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	: 1,5 µl
Taq	: 0,6 µl
Ultra Saf Su	: 7,9 µl
TOPLAM	: 20 µl

PCR Şartları

Ön Ayrışma	: 95 °C	5 dk.	35 Döngü
Ayrışma	: 94 °C	30 s	
Bağlanma	: 54.7 °C	30 s	
Uzama	: 72 °C	1 dk.	
Final Uzama	: 72 °C	10 dk.	
Bekletme	: +4 °C	-----	

3.15. DNA'nın Jelden İzolasyonu

İstenilen bölgenin jelden izole edilmesi amacıyla Qiagen Jel İzolasyon kiti kullanılmıştır. Jel izolasyon kitinin talimatlarına göre izolasyon aşağıdaki basamakları içerecek şekilde yapılmıştır.

- 1) Temiz bir bistüri yardımıyla agaroz jelden DNA fragmenti kesilip çıkarılmıştır.
- 2) Eppendorf tüpünde jeli tartılır. 100 mg jele karşılık yaklaşık 100 µL jelin 1 hacmine 3 hacim kit içinde bulunan Buffer QG eklenir. Örneğin her bir 100 mg jele Buffer QG 300 µL eklenmiştir.
- 3) 10 dakika 50 °C'de bekletilir. Çözünmeye yardımcı olması için inkübasyon süresince 2-3 dakikada bir tüpler vorteksle karıştırmıştır.
- 4) Jel katmanı tamamıyla çözüldükten sonra karışımın renginin sarı olup olmadığı kontrol edilir. Karışımın rengi turuncu veya violet ise 10 µl 3 M NaAc pH:5 ekleyip ve karıştırılmıştır.
- 5) 300 µL isopropanol eklenip ve karıştırılmıştır.
- 6) Pipet yardımıyla tüpteki sıvı Qiaquick spin kolonuna yerleştirilmiştir.
- 7) 1 dakika 13000 RPM'de santrifüj yapılmıştır.
- 8) Altta kalan sıvı uzaklaştırılır ve aynı tüpe kolonuna yerleştirilmiştir.
- 9) 0,5 ml Buffer QG'yi kolona eklenir ve 1 dakika 13000 RPM'de santrifüj yapılır. Alttaki sıvı uzaklaştırılmıştır.
- 10) Kolonu yıkamak için 0,75 ml Buffer PE kolona eklenir ve 1 dakika 13000 RPM'de santrifüj yapılmıştır.
- 11) Altta kalan sıvı uzaklaştırılır. İlave olarak 1 dakika daha kolon 13000 RPM'de santrifüj edilmiştir.

- 12) Temiz eppendorflara kolonlar alınmıştır.
- 13) DNA'yı elde etmek için Buffer EB'den veya DEPC-treated sudan 50 µl kolonun merkezine eklenir ve 1 dakika 13000 RPM'de santrifüj yapılmıştır.
- 14) Elde edilen DNA 20 °C'de saklanmıştır.

3.16. DNA Dizi Analizinin Yapılması

Jelden izole edilen DNA'ların konsantrasyonları ACTGene Spektrofotometre (ACTGene UVIS-99, NJ, USA) kontrol edildikten sonra sekanslama işlemi Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Üniversite Sanayi Kamu İşbirliği Merkezi'nde yapılmıştır. Bu amaçla The BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda nükleotid dizilemesi yapılmıştır.

3.17. Verilerin Değerlendirilmesi

Gen ekspresyon analizinde örneklerin eşik (threshold) değerleri, Bioneer yazılımı tarafından otomatik olarak belirlenmiştir. PCR analiz sonuçlarına göre örneklerin Ct değerlerine ait standart sapmalar Microsoft Excel programı yardımıyla hesaplanmıştır. Standart sapması düşük olan örnekler 3 tekerrür üzerinden değerlendirilmiştir. Buna karşın standart sapmayı yükselten veya azaltan bir tekerrür varsa bu tekerrür çıkarılmış ve ilgili örneğin sonucu 2 tekerrür üzerinden değerlendirilmiştir. Buğday çeşitlerine ait *fw2.2 – 156* geninin ekspresyon düzeyi, Livak ve Schmittgen (2001) göre $\Delta\Delta Ct$ oransal hesaplama algoritması ile belirlenmiştir. RT-PCR analizinde referans gen olarak buğday β -actin geni kullanılmış ve *fw2.2 – 156* gen ifadesinin normalizasyonu referans gen ifadesine göre gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Pfaffl (2006)'ye göre aşağıdaki formüle göre değerlendirilmiştir. Elde edilen diziler ile

aday gen arasındaki benzerlik ve farklılıkları tespit edebilmek amacıyla CLC Sequence Viewer programı kullanılmıştır.

$$Gen\ ifade\ oranı = \frac{(E_{hedef})^{\Delta Ct_{hedef}(Ortalama_{kontrol}-Ortalama_{örnek})}}{(E_{referans})^{\Delta Ct_{referans}(Ortalama_{kontrol}-Ortalama_{örnek})}}$$

3.18. SNP Bölgelerinin Analizi

SNP bölgelerinin tespit edilebilmesi amacıyla internet tabanlı HaploSNPer programının varsayılan ayarları kullanılarak analiz edilmiştir (Tang ve ark., 2006). Programın varsayılan ayarları doğrultusunda elde edilen sekanslar FASTA formatına çevrilerek programa yüklenmiştir. Veri tabanı olarak buğday EST veri tabanı seçilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Aday Ortolog Genin Elde Edilmesi

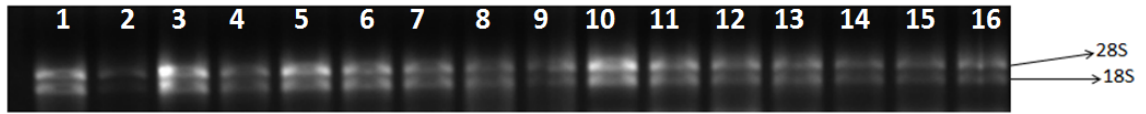
Yapılan biyoinformatik çalışmalar sonucunda Arpa (GenBank ID: 370184) ve Buğday (GenBank ID: AK336220) aday EST nükleotid dizileri belirlenmiştir. Bu EST dizileri protein formuna dönüştürülmüş ve *L. pimpinellifolium* (GenBank ID: AAO12190) ve *L. esculentum* (GenBank ID: AAO12188) protein dizileri ile birlikte analiz edilmiştir (Şekil 4.1.). Bu analize göre Arpa aday ve Buğday aday EST dizileri ile *fw2.2* geninin karşılık gelen bölgesi arasında % 66 özdeş amino asit dizisi belirlenmiştir. Bu oranda bir sekans özdeşlik oranı, filogenetik açıdan domates ile buğday ve arpa arasındaki ortoloji uzaklığı düşünüldüğünde, elde edilebilecek en yüksek özdeşlik oranlarından olduğu söylenebilir.

		20		40		60	
AK370184	-----		-----A	AWSTGLCD	DDCSNCCVTC	LCPCVTFGQI	31
AK336220	-----		-----A	AWSTGLCD	DDCGNCCITC	LCPCITFGQV	31
AAO12188	MYQTVGYNPG	PMKQPYVPPH	YVSAPGTTTA	RWSTGLCHCF	DDPANCLVTS	VCPCITFGQI	60
AAO12190	MYPTVGYNPG	PMKQPYVPPH	YVSAPGTTTA	RWSTGLCHCF	DDPANCLVTS	VCPCITFGQI	60
Consensus	MY-TVGYNPG	PMKQPYVPPH	YVSAPGTTTA	*WSTGLC*CF	DD*ANC*VT*	*CPCITFGQI	
		80		100		120	
AK370184	AEIIDRGSTS	CGASGALYAL	IMCLTGCCQCV	YSCFYRAKMR	AHYGLQESPC	ADCCIHWCC	91
AK336220	AEIIDRGSTS	CGASGALYAL	IMLLTGCCQCV	YSCFYRSKMR	AHYGLQESPC	ADCCIHWCC	91
AAO12188	SEILNKGTTT	CGSRGALYCL	LG-LTG LPSL	YSCFYRSKMR	GQYDLEEAPC	VDCLVHVFC	119
AAO12190	SEILNKGTTT	CGSRGALYCL	LG-LTG LPSL	YSCFYRSKMR	GQYDLEEAPC	VDCLVHVFC	119
Consensus	*EI**G*TS	CG**GALY*L	**L-TG****	YSCFYRSKMR	**Y*L*E*PC	*DC**H**CE	
		140		160			
AK370184	PCALCQEYRE	LKRGFDMNL	GWHANMERQG	RTPATMPPLM	H*GMTR		137
AK336220	PCALCQEYRE	LKRGFDMNL	GWHANMERQG	RTPATMPPLM	H*GMTR		137
AAO12188	PCALCQEYRE	LKNRGFDMGI	GWQANMDRQS	RG-VTMPPY-	HAGMTR		163
AAO12190	PCALCQEYRE	LKNRGFDMGI	GWQANMDRQS	RG-VTMPPY-	HAGMTR		163
Consensus	PCALCQEYRE	LK*RGFDM**	GW*ANM*RQ*	R*P*TMPP*M	H*GMTR		

Şekil 4.1. *H. vulgare* aday (AK370184), *T. aestivum* aday (AK336220), *L. esculentum* (AAO12188) ve *L. pimpinellifolium* (AAO12190) fw2.2 ortolog geninin protein alignmenti

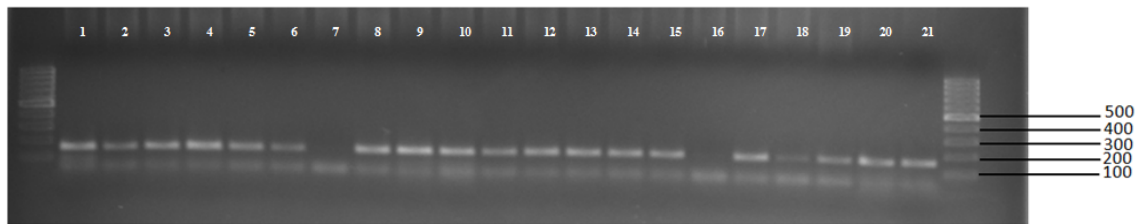
4.2. Toplam RNA Analizleri

RNA izolasyonu işleminin ardından izolasyonun doğrulanması için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır (Şekil 4.2.). Agaroz jel analizi sonucunda parçalanmamış sağlam rRNA bantları gözlenmiştir. Ayrıca jel analizi sonucunda RNA'sı izole edilen çeşitler arasında DNA bulaşığına rastlanmamıştır.



Şekil 4.2. Toplam RNA analizi sonuçlarının jel elektroforezinde görüntüsü. 1: Basribey – 95, 2: Pehlivan, 3: Kaşifbey – 95, 4: Cumhuriyet – 75, 5: Gerek – 79, 6: Bezostaya – 1, 7: Pandas, 8: Bayraktar, 9: İkizce – 96, 10: Kate A - 1, 11: Sultan – 95, 12: Guadalupe, 13: Kırac – 66, 14: Gönen, 15: Ziyabey – 98, 16: *C. spring*. Üstteki band rRNA 28S parçacığı alttaki band 18S rRNA parçacığı

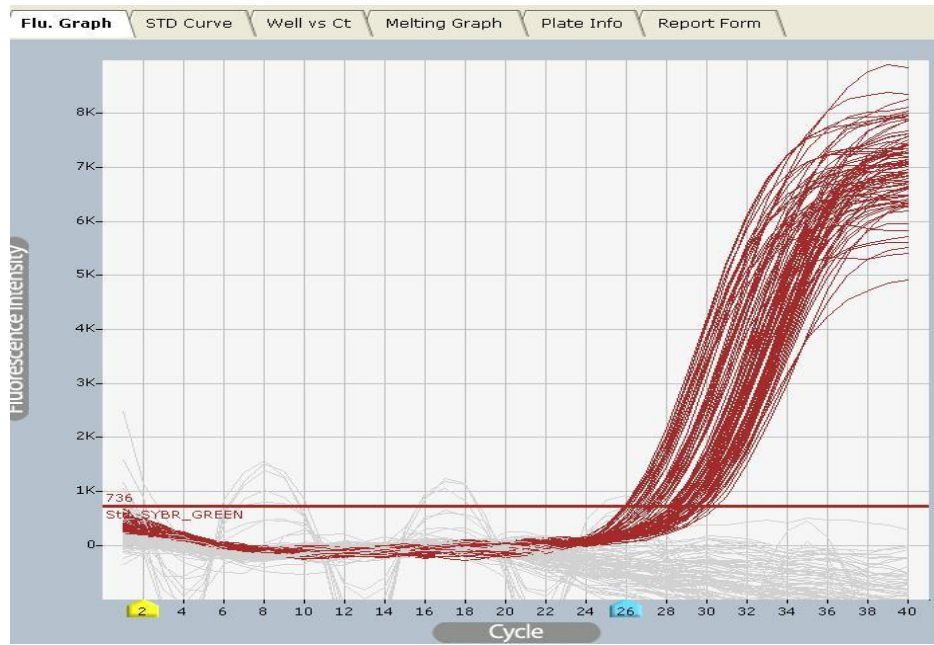
cDNA sentezi işleminden sonra çalışmada kullanılan yabani buğdaylar, ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerine ait cDNA sentezinin kontrolü fw2.2-156 primeri ile PCR sonucu işlemi sonucu Şekil 4.3.'de verilmiş.



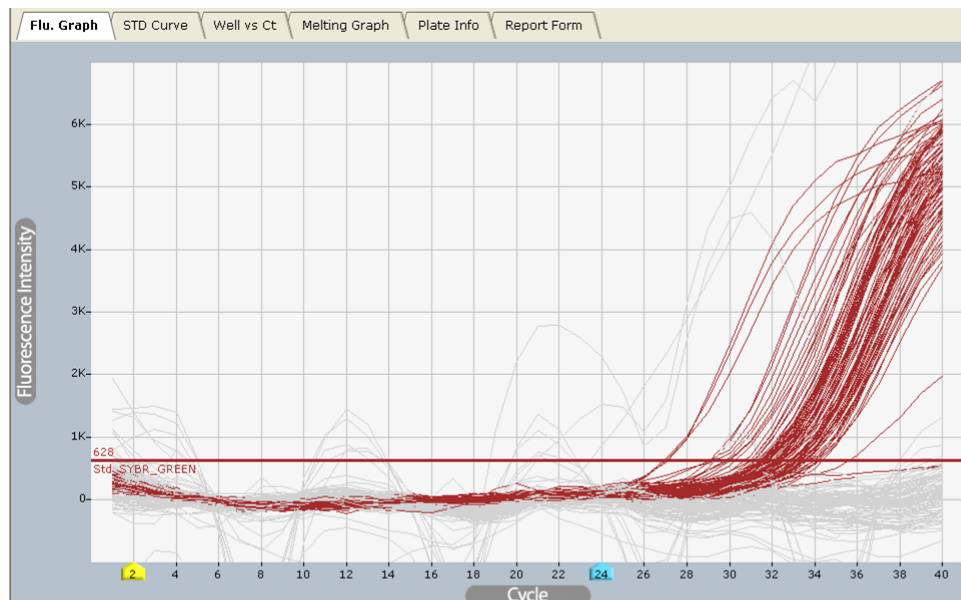
Şekil 4.3. Bazı çeşitlere ait cDNA'ların fw2.2-156 primeri PCR sonuçları. 1: Basribey – 95, 2: Pehlivan, 3: Kaşifbey – 95, 4: Cumhuriyet – 75, 5: Gerek – 79, 6: Bezostaya – 1, 7: Pandas, 8: Bayraktar, 9: İkizce – 96, 10: Kate A - 1, 11: Sultan – 95, 12: Guadalupe, 13: Kırac – 66, 14: Gönen, 15: Ziyabey – 98, 16: *C. spring*, 17: Gün -91, 18: Aydın – 93, 19: Fırat – 93, 20: Ç – 1252, 21: Kunderu – 1149. Sağdaki rakamlar parça büyüklüklerini baz çifti cinsinden vermektedir

cDNA sentezi sonuçları elde edildikten sonra hem referans gen hem de GenBank ID AK336220 fw2.2 bölgesi için sentezlenen primerler ile kantitatif RT-PCR yapılmıştır. fw2.2-156 ve aktin primerleri ile yapılan RT-PCR amplifikasyonu

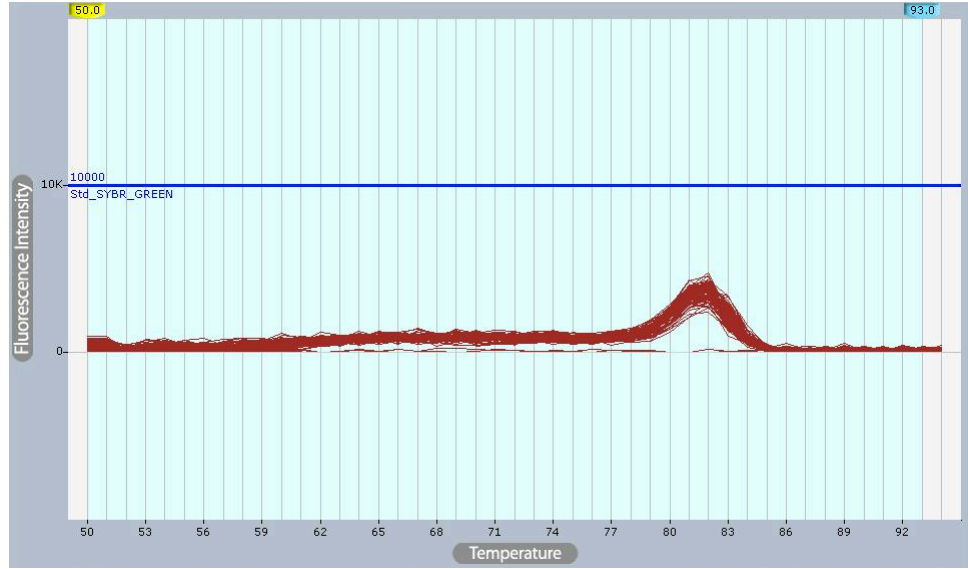
sonucunda çeşitler arasında SYBR-Green sinyal grafiği Şekil 4.4. ve 4.5.'de verilmiştir. Referans olarak yörede yaygın yetiştirilen ortalama verim gösteren ekmeklik buğday olarak Cumhuriyet-75, makarnalık buğday olarak Kunduru-1149 çeşitleri kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca primerlerin dimer oluşturup oluşturmadıklarını kontrol etmek için de melting curve analizi yapılmış ve analiz sonucunda primerlerde dimer oluşturmadıkları tespit edilmiştir (Şekil 4.6. ve 4.7.).



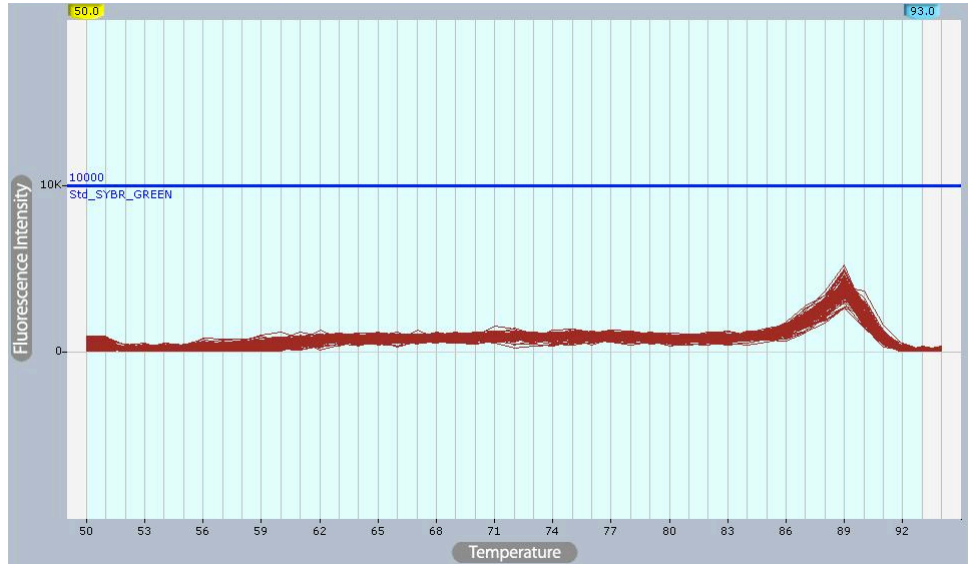
Şekil 4.4. Buğday çeşitlerine ait fw2.2 geni ortoloğunun RT-PCR sonuçları



Şekil 4.5. Buğday çeşitlerine ait β -actin geninin RT-PCR sonuçları

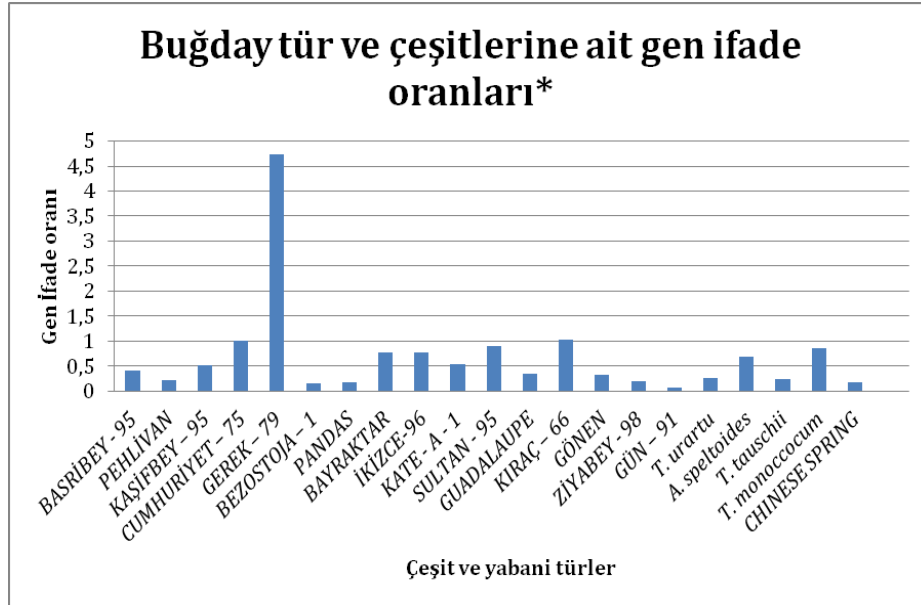


Şekil 4.6. fw 2.2-156 primerine ait melting curve analizi sonucu



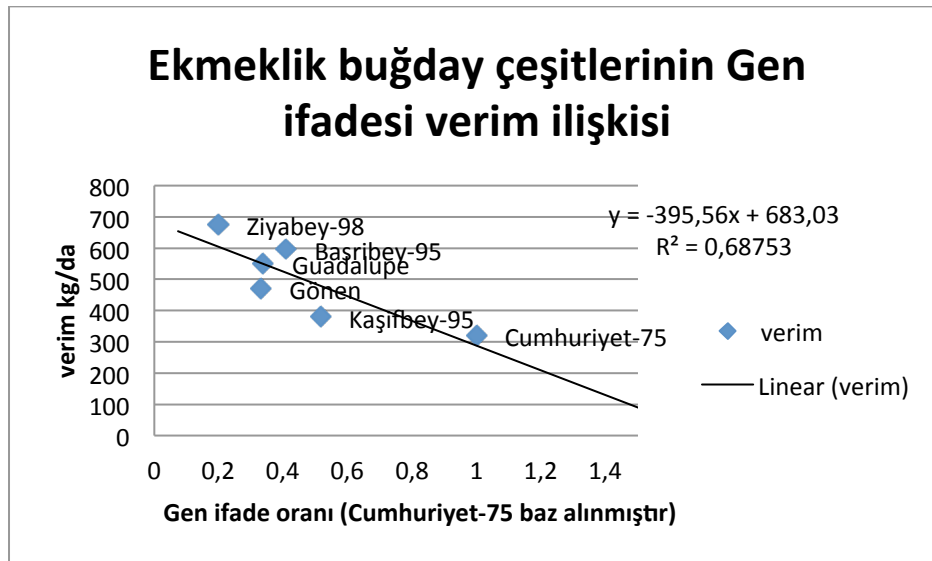
Şekil 4.7. β -actin geninin primerine ait melting curve analiz sonucu

Ekmeklik buğday çeşitlerinde Cumhuriyet - 75 çeşidi baz alınarak yapılan gen ifade analizleri incelendiğinde Gerek – 79 çeşidinde en fazla gen ifadesine rastlanmış en az gen ifadesi de Gün – 91 çeşidinde rastlanmıştır. Gen ifadesi bakımından çeşitler ve türler arasında büyük varyasyonlar gözlenmiştir (Şekil 4.8.).



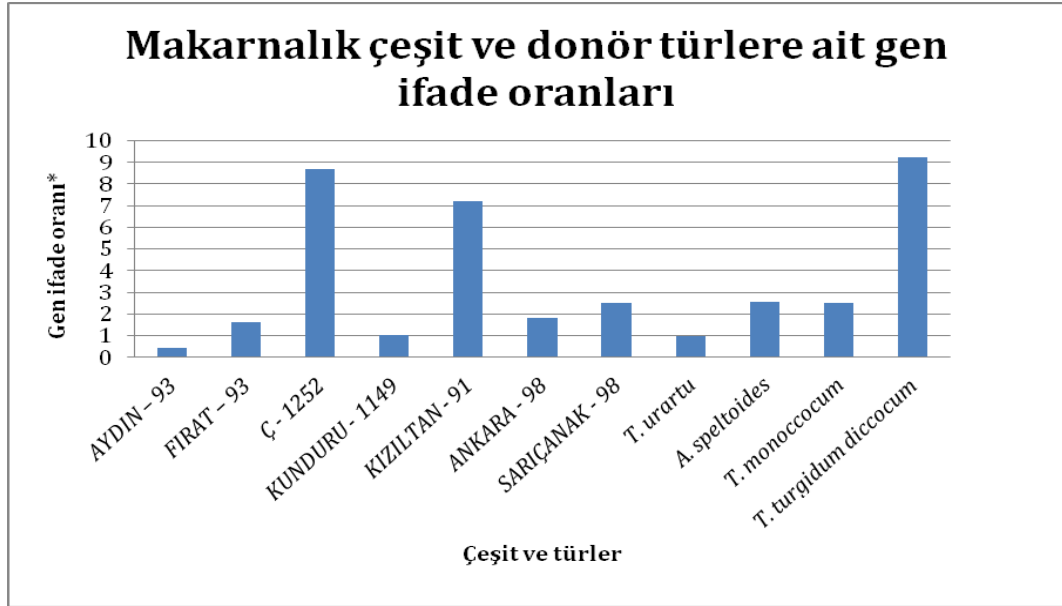
Şekil 4.8. Ekmeklik buğday çeşitleri ve donör akrabalarına ait gen ifade oranları. *gen ifade oranları Doğu Akdeniz Bölgesinde yaygın olarak yetiştirilen Cumhuriyet-75 çeşidi baz alınarak yapılmıştır

Elde edilen gen ifade oranları ekmeklik çeşitlerin verimleri ile olan ilişkileri incelendiğinde ve tüm çeşitler ele alındığında bir ilişki kurulamamıştır. Ancak, Doğu Akdeniz Bölgesine uygun Ziyabey-98, Basribey – 95, Gudalupe, Gönen, Kaşifbey – 95, Cumhuriyet – 75 çeşitleri alındığında verimle gen ifade oranları arasında ters bir orantı elde edilmiştir (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. Ekmeklik Buğday çeşitlerinden sahil kuşağına uygun olanların gen ifade oranlarıyla olan ilişkisi

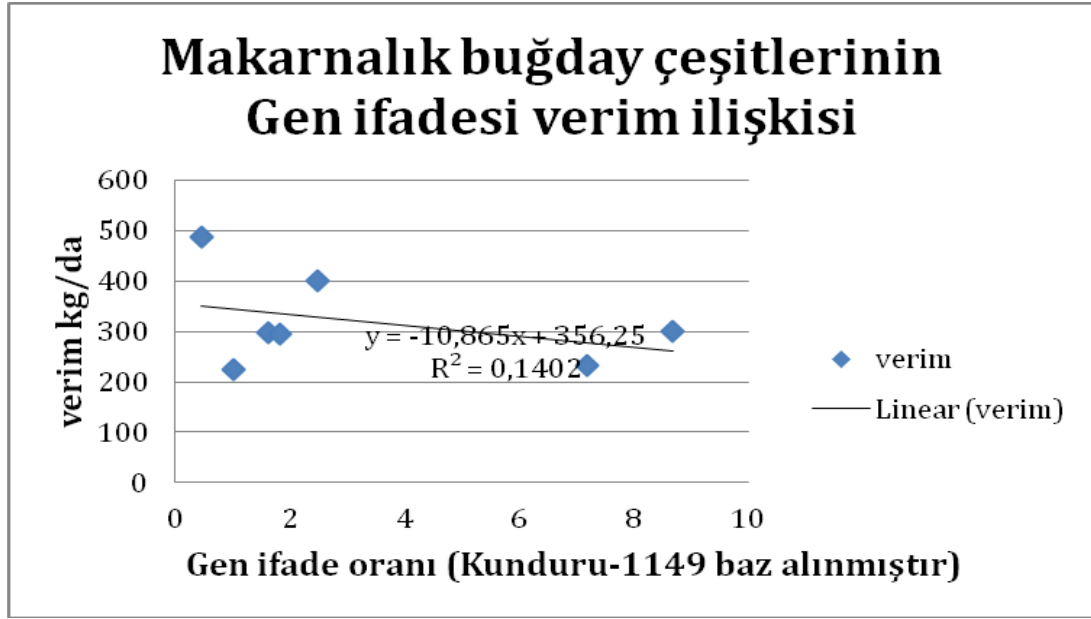
Makarnalık buğday çeşitlerinde gen ifadesi analizi Kunduru – 1149 çeşidi baz alınarak yapılmıştır. Buna göre en fazla gen ifadesi Ç – 1252 çeşidinde görülmüş olup donör türlerden ise en fazla gen ifadesi *T. Turgidum* subps. *diccocon* türünde görülmüştür. En az gen ifadesi ise sırasıyla Aydın – 93 ve *T. urartu*'da görülmüştür (Şekil 4.10.). Kullanılan tür ve çeşitler arasında varyasyon büyük olmuştur.



Şekil 4.10. Makarnalık buğday çeşitleri ve donör akrabalarına ait gen ifade oranları. *gen ifade oranları Türkiye’de yaygın olarak yetiştirilen Kunduru-1149 çeşidi baz alınarak yapılmıştır

Elde edilen gen ifade oranları makarnalık çeşitlerin verimleri ile olan ilişkileri incelendiğinde, tüm çeşitler ele alındığında zayıf ve negatif bir ilişki kurulmuştur. Ancak, buğdayların çoğunun kışlık özellikli olması ve denememizde sahil kuşağında yetişmesi ilişkinin zayıf olmasının başlıca nedeni olabilir (Şekil 4.11.).

Yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlar daha önce yayınlanan çalışmaları destekler niteliktedir. Frary ve ark. (2000) yaptıkları çalışmalarında domates bitkisinde *fw2.2* geninin ifade düzeyinin meyve ağırlığı ile ters ilişkiye sahip olduğunu tespit etmiştir. Yani genin ifade düzeyi arttıkça meyve ağırlığında dramatik bir azalışın var olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde Gou ve ark. (2010) mısır bitkisinde yaptıkları çalışmalarında *fw2.2* genine benzer olarak tespit ettikleri *CNR1* ve *CNR2* genlerinin transgenleri ile analizler yapmıştır.

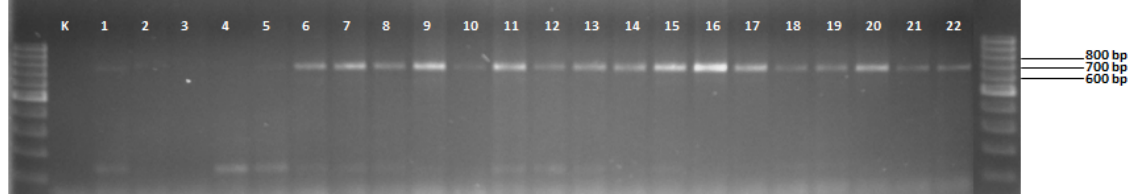


Şekil 4.11. Makarnalık Buğday çeşitlerinin gen ifade oranlarıyla olan ilişkisi. (Kundur-1149 baz alınmıştır)

CNRI geni aşırı ifade edildiğinde bitki büyüklüğünde bir azalışın meydana geldiği diğer taraftan genin ifadesi baskılandığında veya susturulduğunda bitki ve organ büyüklüğünde bir artış tespit edilmiştir. *CNR2* ifadesi doku büyüme aktivitesi ve melez fide direnciyle negatif bir ilişkinin olduğu belirlenmiştir. Bu gen ailesinin mısır bitkisinde heterosisi kontrol ettiği düşünülmektedir. Yine avakado bitkisi ile yapılan çalışma bu sonuçları destekler niteliktedir. Bu çalışmaya göre mitotik siklinlerin (*PaCYCA1* ve *PaCYCB1*) ve *PCNA* transkriptlerinin birikimiyle yapılan Northern analizinde büyüme süresince normal fenotipte basamaklı (gradient) bir azalış olduğu, bunun tersine küçük fenotipte meyve gelişiminin erken dönemlerinde azalışın zaten var olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan yapılan yarı-kantitatif PCR analizinde *Pafw2.2* benzeri mRNA birikimi meyve gelişiminin gözlemlenen tüm dönemlerinde küçük fenotipte normal fenotipin benzer dokularındakinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre domatesteki *Pafw2.2* benzeri gen domates *fw2.2* gibi davrandığı rapor edilmiştir (Dahan ve ark., 2010). Ancak buğdayda daha detaylı ve kontrollü verim çalışmalarının yapılması sonuçların teyidi için önemli katkılar sağlayacaktır.

4.3. DNA Analizleri

Tüm çeşitlerde yapılan PCR çalışmaları sonucunda *fw2.2 Chinese spring* cDNA klonundan elde edilen *fw2.2-643* primerinin jel görüntüsü Şekil 4.12.'de verilmiştir.



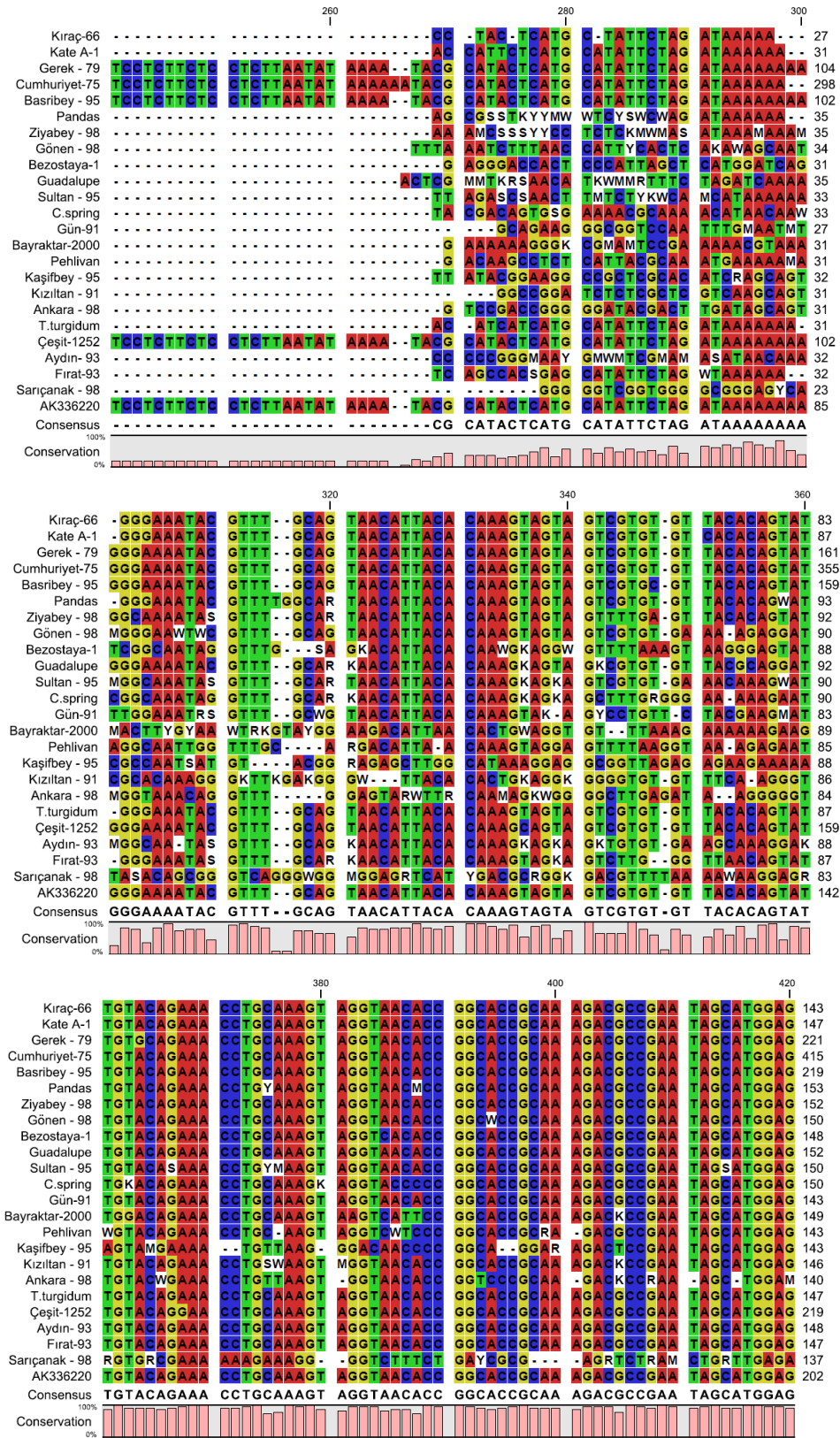
Şekil 4.12. Bazı çeşitlerin ait DNA'larıyla *fw2.2-643* primeri ile yapılan PCR sonucu. K: Kontrol, 1: *T.urartu*, 2: *A. speltoides*, 3: *T. tauschii*, 4: *T. monococcum*, 5: *T. turgidum*, 6: *C. spring*, 7: Bezostaya - 1, 8: Bayraktar, 9: Guadalupe, 10: Cumhuriyet - 75, 11: Ziyabey - 98, 12: Pehlivan, 13: Kaşifbey - 95, 14: Gönen, 15: Pandas, 16: Kate A1, 17: Basribey - 95, 18: Gerek - 79, 19: Sultan - 95, 20: Kırac - 66, 21: İkizce - 96, 22: Gün - 91. En sağdaki rakamlar parça büyüklüklerini baz çifti cinsinden vermektedir

Jel görüntüsü analiz edildiğinde ortalama olarak 700 – 800 bp arasında bant elde edilmiştir. Bu bant daha sonra jelde izole edilerek elde edilen bantın doğruluğu PCR işlemiyle doğrulanmıştır. İstenilen büyüklükte bant veren örnekler sekans analizine tabi tutulmuştur.

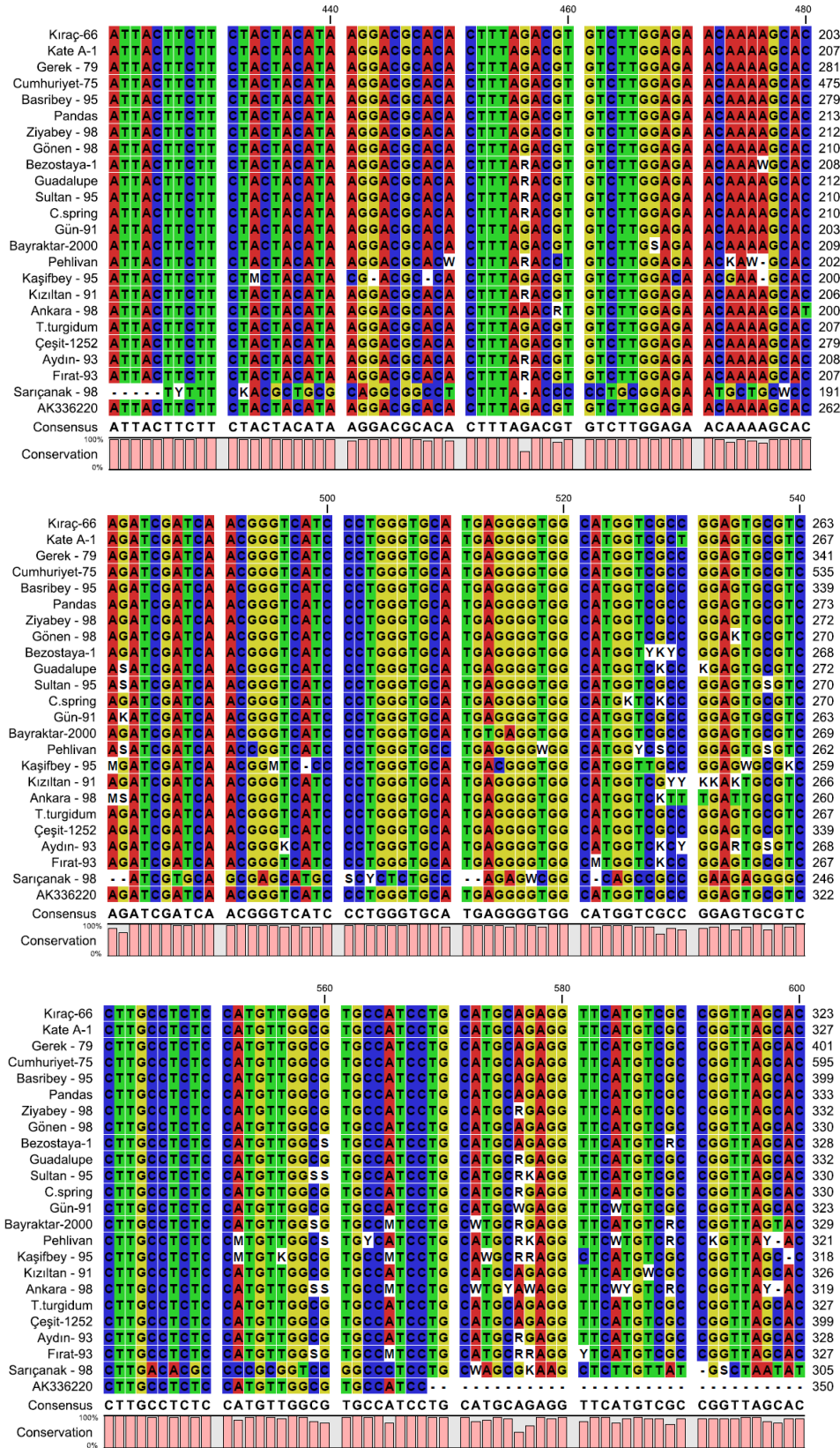
4.4. DNA Sekans Analizi

Kullanılan primer çiftlerinden sadece *fw2.2-643* kodlu primer çeşitlerin çoğunda istenilen büyüklükte PCR ürünü üretmiştir. Kullanılan diğer primer kombinasyonları ya çok kısa ya da hiç fragment üretmemiştir. Temin edilen primer kombinasyonları yabancı donör türlerinden yeterli büyüklükte PCR ürünü almak için elverişli olmamıştır. Başarılı olan bazı primerler de fazla bant üretimi veya klonlama verimindeki düşüklük nedeniyle dizi analizi için uygun olmamıştır. Kullanılan *fw2.2-643* kodlu primerden Kunduru-1149 ve yabancı türler PCR ürünü elde edilmediğinden bu çeşit ve türlerin dizi analizi yapılamamıştır. Geriye kalan tüm çeşitlerin DNA dizi analiz sonuçları Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

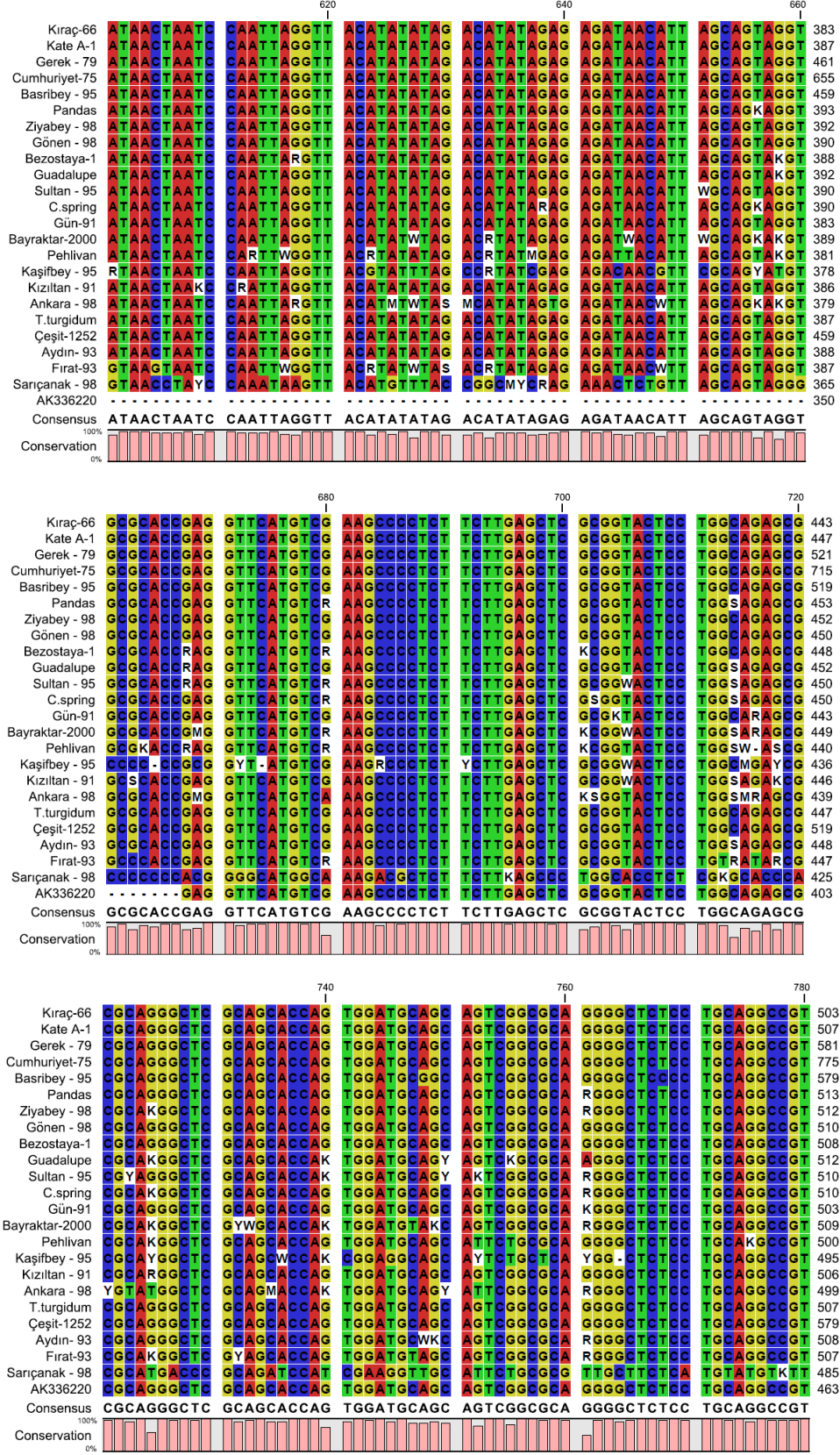
Çizelge 4.1. Çeşitlerin fw2.2-643 kodlu primerden elde edilen PCR ürününün nükleotit baz dizilenmesi sonucu elde edilen sonuçlar



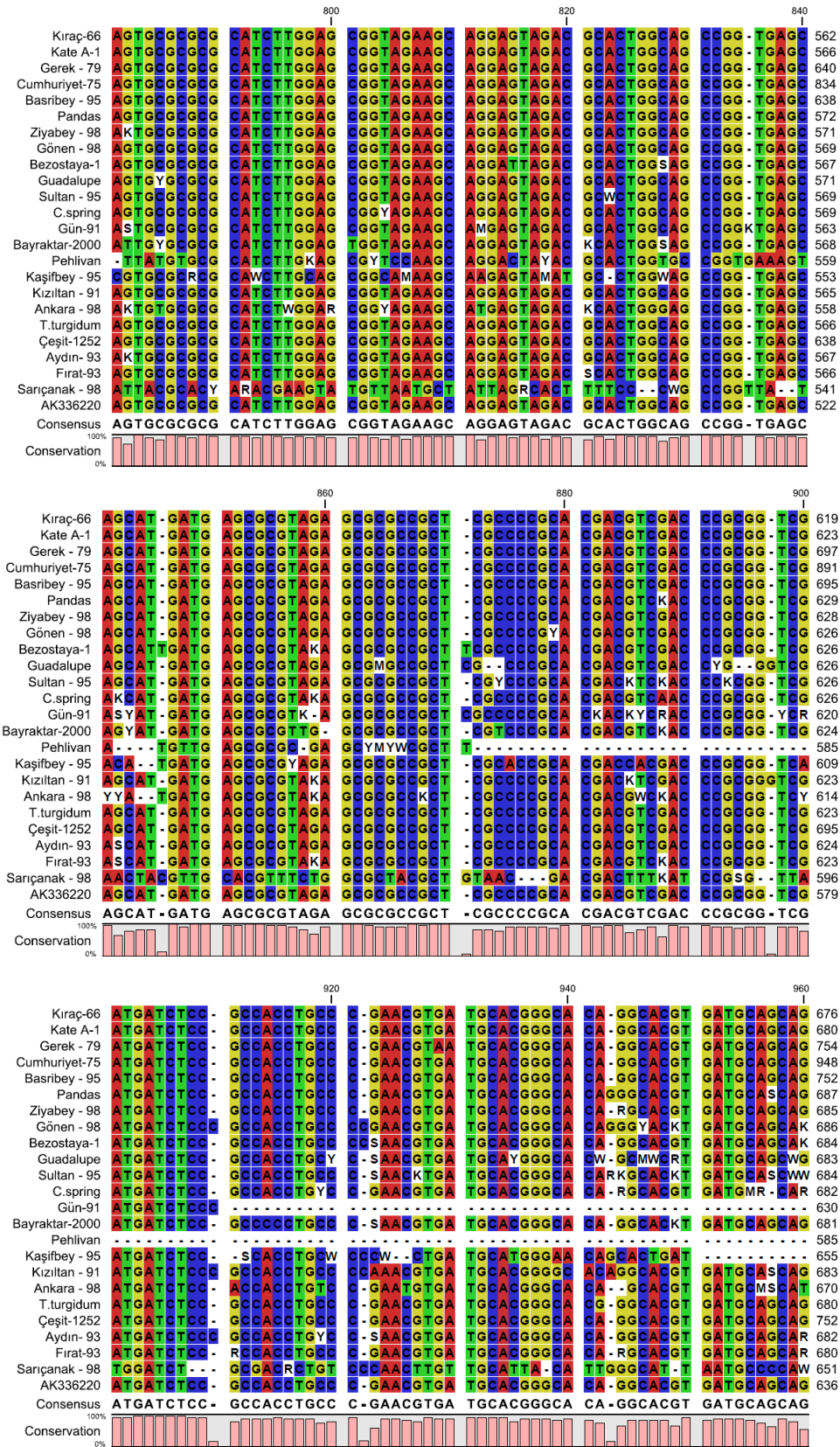
Çizelge 4.1. (Devamı) Çeşitlerin fw2.2-643 kodlu primerden elde edilen PCR ürününün nükleotit baz dizilenmesi sonucu elde edilen sonuçlar



Çizelge 4.1. (Devamı) Çeşitlerin fw2.2-643 kodlu primerden elde edilen PCR ürününün nükleotit baz dizilenmesi sonucu elde edilen sonuçlar



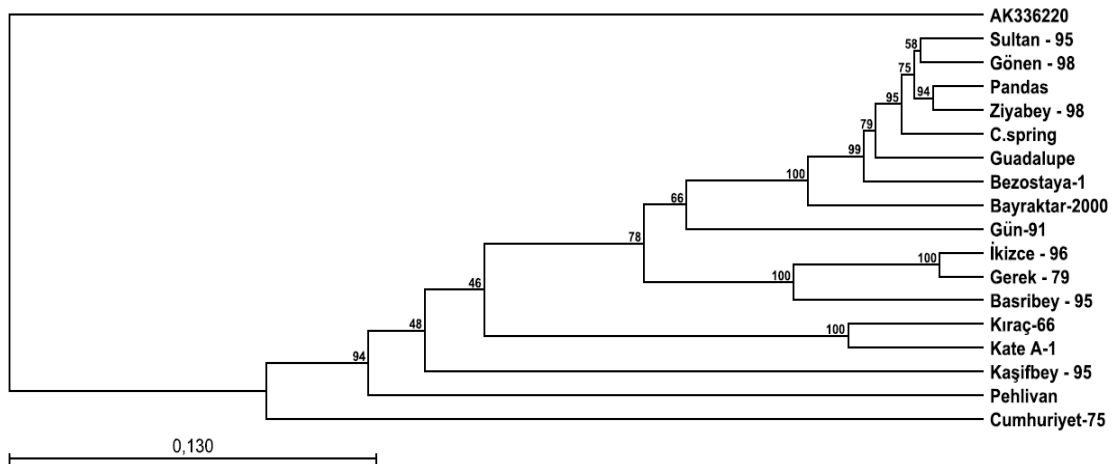
Çizelge 4.1. (Devamı) Çeşitlerin fw2.2-643 kodlu primerden elde edilen PCR ürününün nükleotit baz dizilenmesi sonucu elde edilen sonuçlar



Çizelge 4.1. (Devamı) Çeşitlerin fw2.2-643 kodlu primerden elde edilen PCR ürününün nükleotit baz dizilenmesi sonucu elde edilen sonuçlar

		980	1.000	1.020	
Kıraç-66	TTG-CCGCAG	TCGT-CGAAG	CAGT-CGCAC	AAATCTAG	728
Kate A-1	TTG-CCGCAG	TCGT-CGAAG	CAGT-CGCAC	AAATCTAG	732
Gerek - 79	TTG-CCGCAG	TCGT-CGAAG	CAGT-CGCAC	AAATCTAG	806
Cumhuriyet-75	TTG-CCGCAG	TCGT-CGAAG	CAGT-CGCAC	AAATCTAG	993
Basribey - 95	TTG-CCGCAG	TCGT-CGAAG	CAGT-CGCAC	AAATCTAG	760
Pandas	TTG-CCGCAG	TCGT-CGAAG	CAGT-CGCAC	AAATCTAG	716
Ziyabey - 98	TTG-CCGCAG	TCGT-CGAAG	CAGT-CGCAC	AAATCTAG	713
Gönen - 98	TTGY-CCGCAG	TCGT-CGAAG	CAGT-CGCAC	AAATCTAG	717
Bezostaya-1	TTG-CCGCAG	TCGT-CGAAG	CAGT-CGCAC	AAATCTAG	716
Guadalupe	TTG-CCGCAG	TCGT-CGAAG	CAGT-CGCAC	AAATCTAG	718
Sultan - 95	TTTGGCCGCAK	TCGT-CGAAG	CAGT-CGCAC	AAATCTAG	715
C.spring	TTG-CCGCAG	TCGT-CGAAG	CAGT-CGCAC	AAATCTAG	714
Gün-91	TTTCCCGCAK	TCGT-CGAAG	CAGT-CGCAC	AAATCTAG	630
Bayraktar-2000	TTTCCCGCAK	TCGT-CGAAG	CAGT-CGCAC	AAATCTAG	715
Pehlivan	TTTCCCGCAK	TCGT-CGAAG	CAGT-CGCAC	AAATCTAG	585
Kaşıfbey - 95	TTG-CCGCAG	TCGT-CGAAG	CAGT-CGCAC	AAATCTAG	655
Kızıltan - 91	TTG-CCGCAG	TCGT-CGAAG	CAGT-CGCAC	AAATCTAG	719
Ankara - 98	TTG-CCGCAG	TCGT-CGAAG	CAGT-CGCAC	AAATCTAG	701
T.turgidum	TTG-CCGCAG	TCGT-CGAAG	CAGT-CGCAC	AAATCTAG	732
Çeşit-1252	TTG-CCGCAG	TCGT-CGAAG	CAGT-CGCAC	AAATCTAG	804
Aydın- 93	TTG-CCGCAG	TCGT-CGAAG	CAGT-CGCAC	AAATCTAG	713
Fırat-93	TTG-CCGCAG	TCGT-CGAAG	CAGT-CGCAC	AAATCTAG	711
Sarıçanak - 98	TTG-CCGCAG	TCGT-CGAAG	CAGT-CGCAC	AAATCTAG	682
AK336220	TTG-CCGCAG	TCGT-CGAAG	CAGT-CGCAC	AAATCTAG	693
Consensus	TTG-CCGCAG	TCGT-CGAAG	CAGT-CGCAC	AAATCTAG	
Conservation	100%	100%	100%	100%	

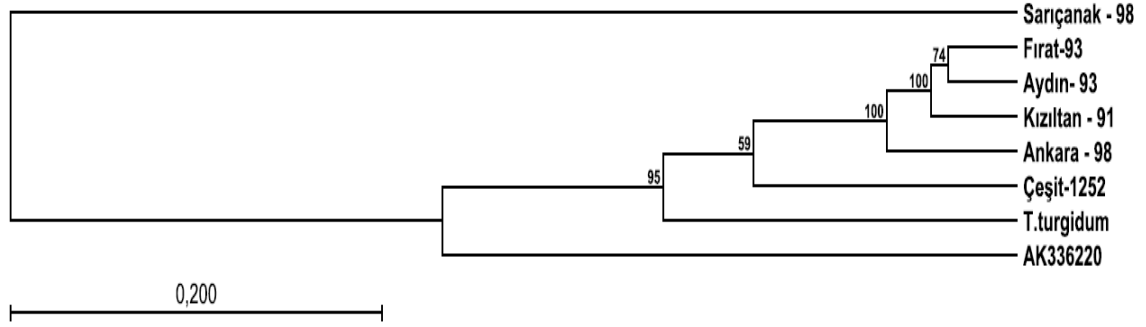
Ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinin dizi analizlerine göre filogenetik ağaçları da elde edilmiş olup çeşitler genelde iki grup altında toplanmıştır (Şekil 4.13. ve 4.14.).



Şekil 4.13. Ekmeklik buğdayda çeşitlerindeki fw2.2 ortoloğunun dizi analizi sonucunda oluşan filogenetik ağaç. Rakamlar Bootstrapping değerlerini göstermektedir

Kullanılan primer yaklaşık 700 baz çifti büyüklüğünde bir parçayı üretmiş ve dizi analizi sonucu bu gen parçası, çeşitlerin çoğunda tamamıyla dizilenmiştir. Dizi analizi sonuçlarına göre çeşitler arasında özellikle 5' yukarı kısımda polimorfizm daha fazla bulunmuş orta kısımlar ve 3' uç kısımları daha korunmuş görülmektedir. Genel itibariyle birçok aday tek nükleotid polimorfizm bölgesi göze çarpmaktadır. Yapılan

BLASTn analizi sonucunda dizi analizi yapılan AK336220 bölgesinin buğdaygiller EST-SSR veri tabanında da benzerlerinin bulunduğu görülmüştür (134/154=%87 benzerlik; gnl|WheatESTSSR|[Sc1580ct869cn993]).



Şekil 4.14. Makarnalık buğdayda çeşitlerindeki *fw2.2* ortoloğunun dizi analizi sonucunda oluşan filogenetik ağaç. Rakamlar Bootstrapping değerlerini göstermektedir

4.5. SNP Analizleri

AK336220 *fw2.2* aday cDNA klonu HaploSNPer programında referans olarak kullanılmıştır. *fw2.2* – 643 isimli primer kullanılarak çeşitlerden elde edilen DNA dizileri kullanılarak AK336220 *fw2.2* aday geni ile karşılaştırılmıştır. *In silico* olarak yapılan bu analizde 5 farklı kümelenme (cluster) meydana gelmiş ve bunlar üzerinde güvenilir SNP'lerin 2 transisyon, 3 transversiyon ve 1 indel SNP olmak üzere toplam 6 SNP bölgesi tespit edilmiştir (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. Buğday aday *fw2.2* bölgesinde tespit edilen SNP'ler

SNP	C/T	A/G	Transisyon	A/T	A/C	C/G	T/G	Transversiyon	Indel
Potansiyel SNP'ler	1	3	4	1	2	2	0	5	7
Güvenilir SNP'ler	0	2	2	0	1	2	0	3	1

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Buğdayın kültüre alınmasından bu yana arazi kullanımında ve tarımsal girdi kullanımındaki gelişmelere paralel olarak klasik seleksiyon ve ıslah yöntemleriyle buğday üretiminde kayda değer artışlar olmuştur. Ancak gen havuzundaki daralmalardan dolayı verim artışı günden güne azalmaktadır. Genomik çalışmalar bitki ıslahına bu konuda büyük yararlar sağlamakta ve varyasyonun nükleotid baz seviyesinde teşhis edilmesine izin vermektedir. Verimin birçok genle idare edilen karmaşık bir karakter olduğu bilinmektedir. Fakat domateste sadece bir gen ile %30 verime katkı sağlanması birçok bitki ıslahçısı için umut kaynağı olmuştur. Buğdayda bu genin ortoloğunun tespit edilmesi benzer bir katkının buğdayda da sağlanabileceği konusunda soruları açığa kavuşturmak için bu öncü çalışma gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda domates *fw2.2* geninin ortoloğu olan bir gen parçasının (AK336220) diğer buğday çeşitlerinde de varlığı ve varsa bunlar arasında bir varyasyon olup olmadığına dair bilgiler açığa kavuşturulmuştur. Daha önce hiçbir çalışma bu genin birçok buğday bitkisinde ifade farklılıkları ve DNA sekans dizi farklılıkları konusunda bilgi sunmamıştır. Çalışmada ayrıca buğdayın atası konumunda olan *T. urartu* (A genomu donörü), *T. monoccocum*, *T. speltoides* (B genom donörü), ve *T. tauschii* (D genom donörü), *T. turgidum* subps. *diccocon* (yabani makarnalık buğday) türleri kullanılmıştır.

Çalışma sonucunda buğdayda bulunan *fw2.2* ortoloğu gen parçasının allelik varyasyonlarının varlığı tespit edilmiş bulunmaktadır. Domates bitkisinde bu gene ait varyasyonun daha çok ifade olmayan uç kısımlarda yer aldığı düşünüldüğünde bu genin buğdayda değişik allelik varyasyonlarının genin içinde de bulunması gen ifadesindeki farklılıkların nedeni olabilir.

Diğer yandan kullanılan genin tüm çeşit ve türlerde ifade edilmesi bu genin bitkiye özel bir gen olduğunu göstermektedir. Ayrıca gen ifadelerinde de büyük farklılıklar mevcuttur. Bu farklılıklar sadece çeşitler arasında değil türler arasında da görülmektedir. Çalışmada kullanılan çeşitlerin Türkiye verim ortalamaları baz alınarak gen ifadeleriyle karşılaştırmalar yapılmıştır. Bu karşılaştırmalar sonucu gen ifadelerinin verimle ters ilişkili olduğu konusunda fikir vermektedir. Ancak çalışma bir öncü

Çalışma niteliğinde olduğundan tarla çeşit verim çalışmaları yapılmamıştır. Bu tür bir karşılaştırmanın daha sağlıklı sonuç vermesi için ilgili genin incelenmesi için tarla verim çalışmalarıyla paralel yapılabilmesidir. Bunun yanında sıcaklık ve nem kontrollü şartlarda verim çalışmalarının yapılması genin aktivitesini daha iyi anlama açısından önemli olabilir.

Çalışmada toplam 931 bazlık AK336220 buğday homoloğu temel alınarak genin i kısımlarından primer tasarımı yapılmıştır. Buğday *fw2.2-643* primeri yaklaşık 700 baz uzunluğunda bir bölge üretmektedir. Ancak, Cumhuriyet-75, Kunduru-1149 eşitleri ve yabani türlerde kullanılan primerle PCR ürünü elde edilememiştir. Bunun nedeni primer bölgelerindeki mutasyonlar olabilir. Çünkü dizi analizlerine bakıldığında gende çeşitler arasında büyük oranda baz polimorfizmleri görünmektedir. Bu bulgular bu genin fonksiyonel işaretleyici olarak kullanılma ihtimalini güçlendirmektedir. Bugüne kadar buğday ve akraba türlerinden 30'dan fazla lokus (gen) klonlanmıştır ve buğday kalite, agronomik özellikleri ve hastalığa dayanıklılık genleriyle ilgili 97 fonksiyonel işaretleyici, 93 adet alleli tanımlamak için geliştirilmiştir (Lui ve ark. 2012). Ancak verimle doğrudan ilişkilendirilmiş fonksiyonel bir marker buğdayda henüz bulunmamıştır. Aynı atadan gelmiş bitkilerde ortolog genlerin türler arasında benzer fenotip oluşturacağı beklenmektedir (Devos, 2005). *O. sativa* L., *Z. mays* L. ve *Brachypodium* gibi dizilenmiş otsu bitki genomlarından yararlanılarak yapılan gen keşifleri buğday için önemli bir materyal olmaktadır (Matsumoto ve ark. 2005; Schnable ve ark. 2009; Vogel ve ark. 2010). Özellikle son yıllarda veri tabanlarının güçlenmesi sonucu, in silico klonlamalar buğdayda istenen karakterlerle ilgili genlerin bulunmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Gill ve Sanseau 2000; He ve ark. 2007, 2008, 2009; Su ve ark. 2011; Ma ve ark. 2012). Çalışmada domatesten klonlanan bir genin buğday veri tabanında da bulunması ve dizilerinin eşleştirilmesi sonucu aday genin fonksiyonel işaretleyici olarak kullanılma potansiyelini artırmaktadır. İlgili genin verim çalışmalarıyla ilişkilendirilmesi işaretleyici (markör) destekli seleksiyon açısından önemli olacaktır. Bu genin buğdayda ifade edilmesinin yanında (Kawaaura ve ark. 2009), farklı çeşitlerde farklı ifade edildiğinin belirlenmesi bu çalışmayla ispatlanmıştır. Bu aday genin dizi bakımından da farklılıklar göstermesi bu genin çeşitlerin tanılanmasında kullanılma olasılığını da artırmaktadır. Bu alışma sonucu

özellikle biyotik ve abiyotik stresle ilgili genlerin türler arasında fonksiyonel işaretleyici olarak kullanılabileceği açısından bulgular önemlidir.

Bu çalışma bir öncü çalışma niteliğinde olup farklı bir türden elde edilen bir genin ortologunun buğdayda varlığının ve ifadesinin tespiti ve hem ifade hem de dizi yönünden çeşitler arasında varyasyon gösterdiğine dair bilgiler sergilemektedir. Bu nedenle, bu çalışmanın sonuçlarının bitki ıslahında daha fazla fayda sağlaması için daha çok çalışma gerekmektedir. Bu gene ait dizi varyasyonlarının verim dâhil diğer agronomik unsurlarla ilişkilendirilmesi mümkündür (Mir ve ark. 2012). Bunun için verim ve agronomik özellik denemelerinin gen ifade analizleri ile paralel olarak yürütülmesi gerekmektedir. Böylece ilgili nükleotid polimorfizminin hangi karakteri nasıl etkileyeceği belirlenebilir. Diğer yandan gen susturma yöntemiyle bu genin susturulması sonucunda gözlenebilecek fenotipik değişimler bu genin fonksiyonel işaretleyici olarak kullanılması ihtimalini artıracak, bu yöntem buğday ve arpada başarıyla kullanılmaktadır (Scofield ve Brandt, 2012). Başka bir husus da proteomik çalışmalardır. Bu genin ifadesi sonucu buğdayda ortaya çıkan protein henüz tespit edilmemiştir. Bu proteinin tespiti ve protein veri tabanlarında analizi genin buğdaydaki fonksiyonunu tam olarak anlama açısından önemli olacaktır. Bu genin maya veya *Arabidopsis* gibi bitkilere aktarılıp protein ifadelerinin incelenmesi bu geni anlamak için bir başlangıç olabilir. Buğday genlerinin bu şekilde maya ve *Arabidopsis*'te ifade edilip incelenmesi bazı transkripsiyon faktörlerinin fonksiyonunu anlamada önemli olmuştur (He ve ark. 2012).

KAYNAKLAR

- Alpert, K.B., Tanksley, S.D., 1996. High-resolution mapping and isolation of a yeast artificial chromosome contig containing *fw2.2*: A major fruit weight quantitative trait locus in tomato. **Proc Natl Acad Sci.**, 93:15503-15507.
- Altenhoff, A.M. and Dessimoz, C., 2012. Inferring Orthology and Paralogy. **Methods in Molecular Biology**, 855: 259 – 276.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, 25: 3389-3402.
- Anonim, 2013a. http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/derleme/d_snp.pdf (Erişim Tarihi: 08.07.2013).
- Anonymous, 2013a. http://www.arabidopsis.org/portals/genAnnotation/other_genomes/ (Erişim Tarihi: 25.05.2013)
- Anonymous, 2013b. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. (Erişim tarihi: 15.03.2013).
- Anonymous, 2013c. Introduction to quantitative PCR. http://qcbs.ca/wiki/_media/stratagene_introduction_to_quantitative_pcr_methods_and_application_guide.pdf (Erişim Tarihi: 19.06.2013).
- Anonymous, 2013d. Real – time PCR application guide. <http://www.genequantification.de/real-time-pcr-guide-bio-rad.pdf> (Erişim tarihi: 19.06.2013).
- Anonymous, 2013e. http://www.smallgrains.ncsu.edu/_Pubs/PGGrowthDevelopment.pdf (Erişim tarihi 05.06.2013).
- Arya, A., Shergill, I.S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., Patel, H.R.H., 2005. Basic Principles of Real Time Quantitative PCR. **Expert Rev. Mol. Diagn.**, 5 (2); 209 – 219.
- Ateş Sönmezoğlu, Ö., Yıldırım, A., Eserkaya Güleç, T., 2010. Tek Nükleotid Farklılıkları (Snp) ve Buğdayda Kullanımı. **Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi**. 3(2): 55-66.
- Auerbach, R.K., 2006. **sDACS: a novel in silico SNP discovery and classification method for bacterial pathogens**. Master Thesis (Unpublished), Northern Arizona University, USA.
- Campbell, B.T., Baenziger, P.S., Gill, K.S., Eskridge, K.M., Budak, H., Erayman, M., Dweikat, I., Yen, Y., 2003. Identification of QTLs and Environmental Interactions Associated with Agronomic Traits on Chromosome 3A of Wheat. **Crop Science.**, 43:1493-1505.
- Chen, F., Mackey, A.J., Vermunt, J.K., Roos, D.S., 2007. Assessing Performance of Orthology Detection Strategies Applied to Eukaryotic Genomes. **PLoS ONE**, 2(4), e383.
- Dahan, Y., Rosenfeld, R., Zadiranov, V., Irihimovitch, V., 2010. A proposed conserved role for an avocado *fw2.2*-like gene as a negative regulator of fruit cell division. **Planta**, 232:663–676.
- Devos, K.M., 2005. Updating the ‘crop circle’. **Curr. Opin. Plant. Biol.**, 8:155–162.
- Dilbirliği, M., Erayman, M., Campbell, B.T., Randhawa, H.S., Baenziger, P.S., Dweikat, I., Gill, K.S., 2006. High-Density Mapping and Comparative Analysis of Agronomically Important Traits on Wheat 3A Chromosome. **Genomics**. 88: 74-87.

- FAO, 2006. Dimensions of need. **An Atlas of Food and Agriculture**. FAO, Rome.
- FAO, 2012a, <http://www.fao.org/statistics/en/> (Erişim Tarihi: 15.07.2012).
- FAO, 2012b. Fao.org (Erişim Tarihi: 15.07.2012).
- Frery, A., Nesbitt, T.C., Grandillo, S., Knaap, E., Cong, B., Liu, J., Meller, J., Elber, R., Alpert, K.B., Tanksley, S.D., 2000. *fw2.2*: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. **Science**, 289:85-88.
- Gill, B.S., Appels, R., Botha-Oberholster, A.M., Buell, C.R., Bennetzen, J.L., Chalhoub, B., Chumley, F., Dvorák, J., Iwanaga, M., Keller, B., Li, W., McCombie, W.R., Ogihara, Y., Quetier, F., Sasaki, T.A., 2004. A workshop report on wheat genome sequencing: International Genome Research on Wheat Consortium. **Genetics**, 168:1087-1096.
- Gill, R.W., Sanseau, P., 2000. Rapid in silico cloning of genes using expressed sequence tags (ESTs). **Biotechnol Annu Rev.**, 5:25-44.
- Guo, M., Rupe, M.A., Dieter, J.A., Zou, J., Spielbauer, D., Duncan, K.E., Howard, R.J., Hou, Z., Simmons, C.R., 2010. Cell number regulator1 affects plant and organ size in maize: implications for crop yield enhancement and heterosis. **Plant Cell**, 22: 1057-1073.
- Guo, M., Simmons, C.R., 2011. Cell number counts – The *fw2.2* and *CNR* genes and implications for controlling plant fruit and organ size, **Plant Science**, 181: 1-7.
- He, X.Y., He, Z.H., Ma, W., Appels, R., Xia, X.C., 2009. Allelic variants of phytoene synthase 1 (*Psy1*) genes in Chinese and CIMMYT wheat cultivars and development of functional markers for flour colour. **Mol. Breed.**, 23:553-563.
- He, X.Y., He, Z.H., Zhang, L.P., Sun, D.J., Morris, C.F., Fuerst, E.P., Xia, X.C., 2007. Allelic variation of polyphenol oxidase (*PPO*) genes located on chromosomes 2A and 2D and development of functional markers for the *PPO* genes in common wheat. **Theor. Appl. Genet.**, 115:47-58.
- He, X.Y., Zhang, Y.L., He, Z.H., Wu, Y.P., Xiao, Y.G., Ma, C.X., Xia, X.C., 2008. Characterization of phytoene synthase 1 gene (*Psy1*) located on common wheat chromosome 7A and development of a functional marker. **Theor. Appl. Genet.**, 116:213-221.
- He, Y., Li, W., Lv, J., Jia, Y., Wang, M. and Xia, G., 2012. Ectopic expression of a wheat *MYB* transcription factor gene, *TaMYB73*, improves salinity stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, 63 (3), pp. 1511-1522.
- Kawaura, K., Mochida, K., Enju, A., Totoki, Y., Toyoda, A., Sakaki, Y., Kai, C., Kawai, J., Hayashizaki, Y., Seki, M., Shinozaki, K. and Ogihara, Y., 2009. Assessment of adaptive evolution between wheat and rice as deduced from the full-length cDNA sequence data and the expression patterns of common wheat. **BMC Genomics**, 10 (1), 271.
- Libault, M., and Stacey, G., 2010. Evolution of *FW2.2*-like (*FWL*) and *PLAC8* genes in eukaryotes. **Plant Signaling & Behavior**, 5:10, 1226-1228.
- Libault, M., Zhang, X.C., Govindarajulu, M., Qiu, J., Ong, Y.T., Brechenmacher, L., Berg, R.H., Hurley-Sommer, A., Taylor, C.G. and Stacey, G., 2010. A member of the highly conserved *FWL* (tomato *FW2.2*-like) gene family is essential for soybean nodule organogenesis. **The Plant Journal**, 62: 852-864.
- Liu, Y., He, Z., Appels, R., Xia, X., 2012. Functional markers in wheat: current status and future prospects. **Theor and App Genet.**, 125:1-10.

- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $[\Delta][\Delta]$ CT Method. **Methods**, 25(4):402 - 408.
- Lübberstedt, T., Zein I., Andersen, JR., Wenzel, G., Krützfeldt, B., Eder, J., Ouzunova, M., Chun, S., 2005. Development and application of functional markers in maize. **Euphytica**, 146:101–108.
- Ma, DY., Yan, J., He, ZH., Wu, L., Xia, XC., 2012. Characterization of a cell wall invertase gene *TaCwi-1* on common wheat chromosome 2A and development of functional markers. **Mol. Breed.**, 29:43–52.
- Matsumoto, T., Wu, J.Z., Kanamori, H., Katayose, Y., Fujisawa, M., Namiki, N., Mizuno, H., Yamamoto, K., Antonio, B.A., Baba, T., Sakata, K., Nagamura, Y., Aoki, H., Arikawa, K., Arita, K., Bito, T., Chiden, Y., Fujitsuka, N, Fukunaka, R., Hamada, M., Harada, C., Hayashi, A., Hijishita, S., Honda, M., Hosokawa, S., Ichikawa, Y., Idonuma, A., Iijima, M., Ikeda, M., Ikeno, M., Ito, K., Ito, S., Ito, T., Ito, Y., Ito, Y., Iwabuchi, A., Kamiya, K., Karasawa, W., Kurita, K., Katagiri, S., Kikuta, A., Kobayashi, H., Kobayashi, N., Machita, K., Maehara, T., Masukawa, M., Mizubayashi, T., Mukai, Y., Nagasaki, H., Nagata, Y., Naito, S., Nakashima, M., Nakama, Y., et al., 2005. The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, 436:793–800.
- Mir, R.R., Kumar, N., Jaiswal, V., Girdharwal, N., Prasad, M., Balyan, H.S. and Gupta, P.K., 2012. Genetic dissection of Grain Weight (GW) in bread wheat through QTL interval and association mapping. **Mol. Breed.**, 29: 963-972.
- P. De Franceschi, P., Stegmeir, T., Cabrera, A., van der Knaap, E., Rosyara, U.R., Sebolt, A.M., Dondini, L., Dirlewanger, E., Quero-Garcia, J., Campoy, J.A., Iezzoni, A.F., 2013. Cell number regulator genes in *Prunus* provide candidate genes for the control of fruit size in sweet and sour cherry. **Mol Breeding**, DOI 10.1007/s11032-013-9872-6.
- Patel, R., 2011. **Orthologous Gene Identification in Plant Species**. University of Toronto, Master Thesis. (Unpublished).
- Pfaffl, M.W., 2006. Real Time PCR. (M.T. Dorak, editor). In: **Relative Quantification**. Taylor & Francis Group, 3: 63 – 82, New York.
- Pfaffl, M.W., 2006. Relative quantification. (M.T. Dorak, Editor). In: **Real - time PCR**. Taylor & Francis Group, 3: 64 -65, New York.
- Pimental, D., Wilson, C., McCallum, C., Huang, R., Dwen, P., Flack, J., Tran, Q., Saltman, T., Cliff, B., 1997. Economical and environmental benefits of biodiversity. **BioScience**, 47:747–757.
- Ponchel, F., 2006. Real-time PCR using SYBR[®] Green. (M.T. Dorak, Editor). In: **Real - time PCR**. Taylor & Francis Group, 8: 114 -146, New York.
- Schnable, P.S., Ware, D., Fulton, R.S., Stein, J.C., Wei, F., Pasternak, S., Liang, C., Zhang, J., Fulton, L., Graves, T.A., Minx, P., Reily, A.D., Courtney, L., Kruchowski, S.S., Tomlinson, C., Strong, C., Delehaunty, K., Fronick, C., Courtney, B., Rock, S.M., Belter, E., Du, F., Kim, K., Abbott, R.M., Cotton, M., Levy, A., Marchetto, P., Ochoa, K., Jackson, S.M., Gillam, B., Chen, W., Yan, L., Higginbotham, J., Cardenas, M., Waligorski, J., Applebaum, E., Phelps, L., Falcone, J., Kanchi, K., Thane, T., Scimone, A., Thane, N., Henke, J., Wang, T., Ruppert, J., Shah, N., et al., 2009. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. **Science**, 326:1112–1115.

- Scofield, S.R., Brandt, A.S., 2012. Virus-induced gene silencing in hexaploid wheat using barley stripe mosaic virus vectors. **Methods Mol Biol.**, 894:93-112.
- Shaghai Maroof, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A. and Allard, R.W., 1984. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 81: 8014–8018.
- Shah, M.M., Baenziger, P.S., Yen, Y., Gill, K.S., Moreno-Sevilla, S., Haliloglu, K., 1999. Genetic analysis of agronomic traits controlled by wheat chromosome 3A. **Crop Sci.**, 39: 1016-1021.
- Singhal, D., Gupta, P., Sharma, P., Kashyap, N., Anand, S. and Sharma, H., 2011. *In-silico* single nucleotide polymorphisms (SNP) mining of *Sorghum bicolor* genome. **African Journal of Biotechnology**. 10 (4): 580-583.
- Soltis, D.E., Albert, V.A., Leebens-Mack, J., Bell, C.D., Paterson, A., Zheng, C., Sankoff, D., Kerr Wall, P., Soltis, P.S., 2009. Polyploidy and angiosperm diversification. **American Journal of Botany**, 96, 336-348.
- Su, Z.Q., Hao, C.Y., Wang, L.F., Dong, Y.C., Zhang, X.Y., 2011. Identification and development of a functional marker of TaGW2 associated with grain weight in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Theor Appl Genet.**, 122:211–223.
- Tang, J., Vosman, B., Voorrips, R.E., van der Linden, C.G., Leunissen, J.A.M., 2006. QualitySNP: a pipeline for detecting single nucleotide polymorphisms and insertions/deletions in EST data from diploid and polyploid species. **BMC Bioinformatics**. 7: p. 438.
- The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, 408: 796–815.
- TUİK, 2013. <http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (Erişim Tarihi: 18.06.2013).
- USDA, 2008. World agricultural supply and demand report, (April 18). **US Department of Agriculture Reports**.
- Van Bel, M., Proost, S., Wischnitzki, E., Movahedi, S., Scheerlinck, C., Van de Peer, Y., and Vandepoele, K., 2012. Dissecting Plant Genomes with the PLAZA Comparative Genomics Platform. **Plant Physiology**, 158: 590–600.
- Varshney, R.K., Graner, A., Sorrells, M.E., 2005. Genomics-assisted breeding for crop improvement. **Trends Plant Sci.**, 10:621–630.
- Vogel, J.P., Garvin, D.F., Mockler, T.C. et al., 2010. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. **Nature**, 463:763–768.
- Wang, X. and Seed, B., 2006. High-throughput primer and probe design. (M.T. Dorak, Editör). In: **Real - time PCR**. Taylor & Francis Group, 5: 95 - 96, New York.
- Wendel, J.F., 2000. Genome evolution in polyploids. **Plant Mol Biol.**, 42: 225-249.
- Werner, J.E., Endo, T.R., Gill, B.S., 1992. Toward a cytogenetically based physical map of the wheat genome. **Proc Natl Acad Sci USA**. 89:11307-11311.
- Yang, Z., Bai, Z., Li, X., Wang, P., Wu, Q., Yang, L., Li, L., Li, X., 2012. SNP identification and allelic-specific PCR markers development for *TaGW2*, a gene linked to wheat kernel weight, **Theor Appl Genet**. 125:1057–1068.
- Yüzbaşıoğlu, A., 2008. **Dejenerasyon Sürecindeki Kas Dokusunda Housekeeping Genlerin Ekspresyon Düzeyinin İncelenmesi**. Yüksek Lisans Tezi (Yayınlanmamış), Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Zadoks, J.C., Chang, T.T., and Konzak, C.F., 1974. A decimal code for growth stages of cereals. **Weed Res.**, 14: 415-421.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının ve projenin yürütülmesi sırasında bana bilgi ve önerileri ile yol göstererek tecrübelerini esirgemedi paylaşan saygıdeğer danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa ERAYMAN' a,

Bu tez çalışması üzerine değerli fikirlerini aldığım Sayın Doç. Dr. Muharrem DİLBİRLİĞİ ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Ufuk DEMİREL'e,

Projenin ve tezin yürütülmesi sırasında bana laboratuvarını açarak bu çalışmanın Devamını sağlayan Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi saygıdeğer hocam Doç. Dr. Turgay ÜNVER'e, Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'nda bulunan saygıdeğer arkadaşlarım Uzman Emine Gülden ERKILIÇ, Araş. Gör. Behçet İNAL ve Doktora öğrencisi Mortaza HAJYZADEH'e,

Çalışmamın her aşamasında değerli katkı ve enerjisini esirgemeyen fedakâr, yaptığı bu fedakârlıktan feragat edebilme sevgisini gösteren can arkadaşım doktora öğrencisi Sayın Abdil Hakan EREN'e,

Tez çalışmasını yürütmekte olduğum Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerine,

Tez çalışmasında bana laboratuvarlarını kullanma izni veren Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi ve Tarla Bitkileri Bölümü öğretim üyelerine,

Tohum örneklerinin elde edilmesinde bana yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Mehmet ATAK'a, Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı Genetik Kaynakları Bölümü'ne,

Bu tez çalışmasının ve projesinin maddi yükümlülüklerini üstlenen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu Başkanlığı'na (TÜBİTAK TOVAG 108 O 465 nolu proje),

Eğitim ve öğretimim süresince maddi ve manevi destek sağlayan ve saygıyı hak eden aileme ve eşimin ailesine,

Doktora eğitimim sırasında göstermiş olduğu sabırdan dolayı biricik eşim Ceren ÖZTÜRK İLHAN'a sonsuz teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Erzurum'da doğdum. İlk, Orta ve Lise'yi Erzurum'da okudum. 2000 yılında girdiğim Karadeniz Teknik Üniversitesi Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği bölümünden 2004 yılında mezun oldum. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünde Bilimsel Hazırlık programına dâhil oldum. 2005 yılında İngilizce Hazırlık olarak 2009 yılında Tarla Bitkileri Yetiştiriciliği ve Islahı Anabilim Dalından Yüksek Lisans Derecesi olarak mezun oldum. 2009 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoloji Anabilim Dalında doktora başladım. 2009 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Altınözü Meslek Yüksekokulunda Öğretim Görevlisi oldum. Hala Mustafa Kemal Üniversitesi Altınözü Meslek Yüksekokulu'nda görevine devam etmekteyim.

EKLER

Ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerine ait fw2.2 aday gen dizilimleri.

>Triticum-1|Triticum|Triticum turgidum

CACATCATCATGCATATTCTAGATAAAAAAAGGGAAATACGTTTGCAGTAA
CATTACACAAAGTAGTAGTCGTGTGTTACACAGTATTGTACAGAAACCTGC
AAAGTAGGTAACACCGGCACCGCAAAGACGCCGAATAGCATGGAGATTACT
TCTTCTACTACATAAGGACGCACACTTTAGACGTGTCTTGGAGAACAAAAG
CACAGATCGATCAACGGGTTCATCCCTGGGTGCATGAGGGGTGGCATGGTCG
CCGGAGTGCCTCCTTGCCTCTCCATGTTGGCGTGCCATCCTGCATGCAGAGG
TTCATGTCGCCGGTTAGCACATAACTAATCCAATTAGGTTACATATATAGAC
ATATAGAGAGATAACATTAGCAGTAGGTGCGCACCGAGGTTTCATGTCTGAAG
CCCCTCTTCTTGAGCTCGCGGTACTCCTGGCAGAGCGCGCAGGGCTCGCAGC
ACCAGTGGATGCAGCAGTCGGCGCAGGGGCTCTCCTGCAGGCCGTAGTGCG
CGCGCATCTTGGAGCGGTAGAAGCAGGAGTAGACGCACTGGCAGCCGGTGA
GCAGCATGATGAGCGCGTAGAGCGCGCCGCTCGCCCCGCACGACGTCTGACC
CGCGGTCTGATGATCTCCGCCACCTGCCCCGAACGTGATGCACGGGCACGGGC
ACGTGATGCAGCAGTTGCCGCAGTCGTCTGAAGCAGTCGCACAAATCTAGAT
GCATTCGCGAGGTACCGAGCTCGAATTCCTGGGCCGTCGTTTTACAACGTC
GTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCC
CCTTTTCGCAGCTGGGCGTATAGCGAAGAGCCCGCACGATCGCCACCCACA
GTGCGCAGGCTGGATTGCGATGCAATGTAAGCGATGATATTTGGTAAATCC
GATAACTTTAGCTAGTCAGCTCAGTTTTTGAGTCA

>Triticum-2|Triticum|Çeşit-1252

AGGTGATGCTCTGCAGTCGACGGGCCCCGGGATCCGATTCCCTTATCCTCTTC
TCCTCTTAATATAAAAATACGCATACTCATGCATATTCTAGATAAAAAAAGG
GAAAATACGTTTGCAGTAACATTACACAAAGCAGTAGTCGTGTGTTACACA
GTATTGTACAGGAACCTGCAAAGTAGGTAACACCGGCACCGCAAAGACGCC
GAATAGCATGGAGATTACTTCTTCTACTACATAAGGACGCACACTTTAGACG
TGTCTTGGAGAACAAAAGCACAGATCGATCAACGGGTTCATCCCTGGGTGCA
TGAGGGGTGGCATGGTCGCCGGAGTGCGTCCTTGCCTCTCCATGTTGGCGTG
CCATCCTGCATGCAGAGGTTTCATGTCTGCCGGTTAGCACATAACTAATCCAAT
TAGGTTACATATATAGACATATAGAGAGATAACATTAGCAGTAGGTGCGCA
CCGAGGTTTCATGTCTGAAGCCCCCTCTTCTTGAGCTCGCGGTACTCCTGGCAGA
GCGCGCAGGGCTCGCAGCACCGAGTGGATGCAGCAGTCGGCGCAGGGGCTCT
CCTGCAGGCCGTAGTGCGCGCGCATCTTGGAGCGGTAGAAGCAGGAGTAGA
CGCACTGGCAGCCGGTGAGCAGCATGATGAGCGCGTAGAGCGCGCCGCTCG
CCCCGCACGACGTCTGACCCGCGGTTCATGATGATCTCCGCCACCTGCCCGAACG
TGATGCACGGGCACAGGCACGTGATGCAGCAGTTGCCGCAGTCGTCTGAAGC
AGTCGCACAAATCTAGATGCATTCGCGAGGTACCGAGCTCGAATTCCTGG
CCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCG

>Triticum-3|Triticum|Aydın - 93

CCCCCGGMAAYGMWMTTCGMAMASATAACAAAMGGCAATASGTTTGCAG
 KAACATTACACAAAGKAGKAGKTGTGTGAAGCAAAGGAKTGTACAGAAAC
 CTGCAAAGTAGGTAACACCGGCACCGCAAAGACGCCGAATAGCATGGAGA
 TTA CT TCT TCT ACT ACATAAGGACGCACACTTTARACGTGTCTTGGAGAACAA
 AAAGCACAGATCGATCAACGGGKCATCCCTGGGTGCATGAGGGGTGGCATG
 GTCKCYGGARTGSGTCCTTGCCTCTCCATGTTGGCGTGCCATCCTGCATGCR
 GAGGTTTCATGTGCGCCGGTTAGCACATAACTAATCCAATTAGGTTACATATAT
 AGACATATAGAGAGATAACATTAGCAGTAGGTGCGCACCGAGGTTTCATGTC
 GAAGCCCCTCTTCTTGAGCTCGCGGTACTCCTGGSAGAGCGCGCAGGGCTCG
 CAGCACCAAGTGGATGCWKCAGTCGGCGCARGGGCTCTCCTGCAGGCCGTAK
 TGCGCGCGCATCTTGGAGCGGTAGAAGCAGGAGTAGACGCACTGGCAGCCG
 GTGAGCASCATGATGAGCGCGTAGAGCGCGCCGCTCGCCCCGCACGACGTC
 GACCCGCGGTTCGATGATCTCCCGCCACCTGYCCSAACGTGATGCACGGGCA
 CAGGCACGTGATGCAGCARTTGCCGCAKWCGTCGAAGCARKYCGCACAAA
 G

>Triticum-4|Triticum|Kızıltan - 91

TACAGGCCGGATCTCTCGCTCGTCAAGCAGTCGCACAAAGGGKTTKGAKGG
 GWTTACACACTGKAGGKGGGGTGTGTTTCAAGGGTTGTACAGAAACCTGSW
 AAGTMGGTAACACCGGCACCGCAAAGACKCCGAATAGCATGGAGATTACT
 TCTTCTACTACATAAGGACGCACACTTTARACGTGTCTTGGAGAACAAAAGC
 ACAGATCGATCAACGGGTTCATCCCTGGGTGCATGAGGGGTGGCATGGTCGY
 YKKAKTGCGTCCTTGCCTCTCCATGTTGGCGTGCCATCCTGCATGCAGAGGT
 TCATGWCGCCGGTTAGCACATAACTAAKCCRATTAGGTTACATATATAGAC
 ATATAGAGAGATAACATTAGCAGTAGGTGCGCACCGAGGTTTCATGTCGAAG
 CCCCTCTTCTTGAGCTCGCGGWACTCCTGGSAGAKCGCGCARGGCTCGCAG
 CACCAGTGGATGCAGCAGTCGGCGCAGGGGCTCTCCTGCAGGCCGTAGTGC
 GCGCGCATCTTGGAGCGGTAGAAGCAGGAGTAGACGCACTGGCAGCCGGTG
 AGCAGCATGATGAGCGCGTAKAGCGCGCCGCTCGCCCCGCACGACKTCGAC
 CCGCGGGTCGATGATCTCCCGCCACCTGCCCCAAACGTGATGCACGGGGCA
 CAGGCACGTGATGCASCAGTTGCCCGCAGTCGTYCGAAGCAKTTCGCACAA
 AGTT

>Triticum-5|Triticum|Fırat – 93

GTTCAGCCACSGAGCATATTCTAGWTAAGGAAATASGTTTGCARKA
 ACATTACACAAAGTAGKAGTCTTGGGTAAACAGTATTGTACAGAAACCTGC
 AAAGTAGGTAACACCGGCACCGCAAAGACGCCGAATAGCATGGAGATTACT
 TCTTCTACTACATAAGGACGCACACTTTARACGTGTCTTGGAGAACAAAAGC
 ACAGATCGATCAACGGGTTCATCCCTGGGTGCATGAGGGGTGGCMTGGTCKC
 CGGAGTGCGTCCTTGCCTCTCCATGTTGGSGTGCCMTCTGCATGCRRAGGY
 TCATGTGCGCCGGTTAGCACGTAAGTAATCCAATTWGGTTACRTATWTASAC
 RTATAGAGAGATAACWTTAGCAGTAGGTGCCACCGAGGTTTCATGTCRAAG
 CCCCTCTTCTTGAGCTCGCGGTACTCCTGTRATARC GCGCAKGGCTCGYAGC
 ACCAGTGGATGTAGCAGTCGGCGCARGGGCTCTCCTGCAGGCCGTAGTGCG
 CGCGCATCTTGGAGCGGTAGAAGCAGGAGTAGACSCACTGGCAGCCGGTGA
 GCASCATGATGAGCGCGTAKAGCGCGCCGCTCGCCCCGCACGACGTCKACC
 CGCGGTTCGATGATCTCCRCCACCTGCCCCAACGTGATGCACGGGCACARGC

ACGTGATGCAGCARTTGCATCAKWCGTCGAAACAGTCGAAAAAAGA

>Triticum-6|Triticum|Ankara - 98

GTCCGACCGGGGGATACGACTTGATAGCAGTMGGTAAACAGGTTTGGAGTA
 RWTRCAAMAGKWGGGGCTTGAGATAAGGGGGTTGTACWGAAACCTGTTA
 AGTGGTAACACCGGTCCCGCAAGACKCCRAAAGCTGGAMATTACTTCTTCT
 ACTACATAAGGACGCACACTTTAAACRTGTCTTGGAGAACAAAAGCATMSA
 TCGATCAACGGGTTCATCCCTGGGTGCATGAGGGGTGGCATGGTCKTTTGATT
 GCGTCCTTGCCTCTCCATGTTGGSSTGCCMTCTGTCWTGYAWAGGTTTCWYG
 TCRCCGGTTAYACATAACTAATCCAATTARGTTACATMTWTASMCATATAG
 TGAGATAACWTTAGCAGKAKGTGCGCACCGMGGTTCATGTCAAAGCCCCTC
 TTCTTGAGCTCKSGGTACTCCTGGSMRAGCGYGTATGGCTCGCAGMACCAK
 TGGATGCAGYATTCGGCGCARGGGCTCTCTGCAGGCCGTAKTGTGCGCGC
 ATCTWGGARCGGYAGAAGCATGAGTAGACKCACTGGGAGCCGGTGAGCY
 ATGATGAGCGCGTAKAGCGCGCKCTCGCCCCGCACGACGWCKACCCGCG
 GTCYATGATCTCCACCACCTGTCCGAATGTGATGCACGGGCACAGCACGTG
 ATGCMSCATTGCCGCAKTCGWCAAKACAATCCAAAAAACT

>Triticum-7|Triticum|Sarıçanak - 98

GGGGGTCGGTGGGGCGGGAGYCATASACAGCGGGTCAGGGWGGMGGAGRT
 CATYGACGCRGGKGACGTTTTTAAAAWAAGGAGRRGTGRCGAAAAAAGAAA
 GGGGTCTTTCTGAYCGCGAGRTCTRAMCTGRTTGAGATYTTTCKACGCTGCG
 CAGGCGGCCTCTTTAACCCCTGCGGAGAATGCTGCWCCATCGTGCAGCGA
 GCATGCSCYCTCTGCCAGAGWCGGCCAGCCGCCGAAGAGGGGCCCTTGACAC
 GCCCCGCGGTCCGGCCCTCCTGCWAGCGKAAGCTCTTGTTATGSCTAATATG
 TAACCTAYCCAAATAAGTTACATGTTTACCGGCMYCRAGAAACTCTGTTAG
 CAGTAGGGCCCCCCCCACGGGGCATGGCAAAGACGCTCTTCTTKAGCCCTGG
 CACCTCTCGKGCACCCACGCATGACCCGCAGATCCATCGAAGGTTGCATTCT
 GCGCGTTGCTTCTCATGTATGKTTATTACGCACYARACGAAGTATGTTAAT
 GCTATTAGRCACCTTTTCCCWCGCGGTTATAACTACGTTGCACGTTTCTGGCG
 CTACGCTGTAAACGACGACTTTKATCCGSGTTATGGATCTGCGACRCTGTCCC
 AACTTGTTGCATTACATTGGGCATTAATGCCCCAWTTCATATTACGACGAS
 AAAAKGCACAAAGAGRAT

>Triticum-8|Triticum|C. spring

GTACGACAGTGSGAAAACGCAAAACATAACAACWCGGCAAATAGGTTTGCA
 RKAACATTACACAAAGKAGKAGCTTTGRGGGAAAAAGAATTGKACAGAAA
 CCTGCAAAGKAGGTACCCCCGGCACCGCAAAGACGCCGAATAGCATGGAG
 ATTACTTCTTCTACTACATAAGGACGCACACTTTARACGTGTCTTGGAGAAC
 AAAAGCACAGATCGATCAACGGGTTCATCCCTGGGTGCATGAGGGGTGGCAT
 GKTCKCCGGAGTGCGTCCTTGCCCTCTCCATGTTGGCGTGCCATCCTGCATGC
 RGAGGTTTCATGTCGCCGGTTAGCACATAACTAATCCAATTAGGTTACATATA
 TAGACATATARAGAGATAACATTAGCAGKAGGTGCGCACCGAGGTTTCATGT
 CRAAGCCCCTCTTCTTGAGCTCGSGGTACTCCTGGSAGAGCGCGCAKGGCTC
 GCAGCACCAAGTGGATGCAGCAGTCGGCGCARGGGCTCTCTGCAGGCCGTA
 GTGCGCGCGCATCTTGGAGCGGYAGAAGCAGGAGTAGACGCACTGGCAGC
 CGGTGAGCAKCATGATGAGCGCGTAKAGCGCGCCGCTCGCCCCGCACGACG
 TCAACCCGCGGTTCGATGATCTCCGCCACCTGYCCGAACGTGATGCACGGGC

ACARGCACGTGATGMRCARTTGCCGCAGWCGWCGAAGCARRTCRCACAAG
T

>Triticum-9|Triticum|Bezostaya – 1

GAGGGACCACTCCCATTAGCTCATGGATCAGTCGGCAATAGGTTTGSAGKA
CATTACACAAWKGAGGWGTTTTAAAGTAAGGGAGTATTGTACAGAAACCT
GCAAAGTAGGTACACACCGGCACCGCAAAGACGCCGAATAGCATGGAGATT
ACTTCTTCTACTACATAAGGACGCACACTTTARACGTGTCTTGGAGAACAAA
WGCACAGATCGATCAACGGGTCATCCCTGGGTGCATGAGGGGTGGCATGGT
YKYCGGAGTGCGTCCTTGCCCTCTCCATGTTGGCSTGCCATCCTGCATGCAGA
GGTTCATGTCRCCGGTTAGCACATAACTAATCCAATTARGTTACATATATAG
ACATATAGAGAGATAACATTAGCAGTAKGTGCGCACCRAGGTTTCATGTCRA
AGCCCCTCTTCTTGAGCTCKCGGTACTCCTGGCAGAGCGCGCAGGGGCTCGCA
GCACCAGTGGATGCAGCAGTCGGCGCAGGGGCTCTCCTGCAGGCCGTAGTG
CGCGCGCATCTTGGAGCGGTAGAAGCAGGATTAGACGCACTGGSAGCCGGT
GAGCAGCATTGATGAGCGCGTAKAGCGCGCCGCTTCGCCCCGCACGACGTC
GACCCGCGGTTCGATGATCTCCGCCACCTGCCCCSAACGTGATGCACGGGCA
CAGGCACGTGATGCAGCAKTTGCCCGCATTCGWCGAAGCARTCGCACAAAT

>Triticum-10|Triticum|Pandas

GTTCCAGCGSSTKYWMWTCYSWCWAGATAAAAAAGGGAAATACGTTTTG
GCARTAACATTACACAAAGTAGTAGTCGTGTGTTACACAGWATTGTACAGA
AACCTGYAAAGTAGGTAACMCCGGCACCGCAAAGACGCCGAATAGCATGG
AGATTACTTCTTCTACTACATAAGGACGCACACTTTAGACGTGTCTTGGAGA
ACAAAAGCACAGATCGATCAACGGGTCATCCCTGGGTGCATGAGGGGTGGC
ATGGTCGCCGGAGTGCGTCCTTGCCCTCTCCATGTTGGCGTGCCATCCTGCAT
GCAGAGGTTTCATGTCGCCGGTTAGCACATAACTAATCCAATTAGGTTACATA
TATAGACATATAGAGAGATAACATTAGCAGKAGGTGCGCACCGAGGTTTCAT
GTCRAAGCCCCTCTTCTTGAGCTCGCGGTACTCCTGGSAGAGCGCGCAGGGC
TCGCAGCACCAAGTGGATGCAGCAGTCGGCGCARGGGCTCTCCTGCAGGCCG
TAGTGCGCGCGCATCTTGGAGCGGTAGAAGCAGGAGTAGACGCACTGGCAG
CCGGTGAGCAGCATGATGAGCGCGTAGAGCGCGCCGCTCGCCCCGCACGAC
GTCKACCCGCGGTTCGATGATCTCCGCCACCTGCCCCAACGTGATGCACGGG
CACAGGGCACGTGATGCASCAGTTGCCCGCAGTCGTCTGAARCARTCGCACAA

>Triticum-11|Triticum|Kaşifbey - 95

TTATACGGAAGGCCGCTCGCACATCRAGCAGTCGCCAATSATGTACGGRAG
AGCTTGGCATAAAGGAGGCGGTTAGAGAGAAGAAAAAGTAMGAAAATGT
TAAGGGACAACCCCGGCAGGARAGACTCCGAATAGCATGGAGATTACTTCT
TCTMCTACATACGACGCCACTTTAGACGTGTCTTGGACAACGAAGCACMGA
TCGATCAACGGMTCCCCCTGGGTGCATGACGGGTGGCATGGTTGCCGGAGW
GCGKCCTTGCCCTCTCCMTGTKGGCGTGCCMTCCCTGCAWGCRRAGGCTCATG
TCGCCGGTTAGCCRTAACTAATCCAATTAGGTTACGTATTTAGCCRTATCGA
GAGACAACGTTTCGCAGYATGTCCCCCGCGGYTATGTCTGAAGRCCCTCTYC
TTGAGCTCGCGGWACTCCTGGCMGAYCGCGCAYGGCTCGCAGCWCCAACG
GAGGCAGCAYTCTGCTCAYGGCTCTCCTGCAGGCCGTCGTGCGCRGCAWC
TTGCAGCGGCAMAAGCAAGAGTAMATGCCTGGWAGCCGGTGAGCACATGA
TGAGCGCGYAGAGCGCGCCGCTCGCACCGCACGACCACGACCCGCGGTCAA

TGATCTCCSCACCTGCWCCCWCTGATGCATGGGAACAGCACTGAT

>Triticum-12|Triticum|Gönen

TTTAAATCTTTAACCATTYCACTCAKAWAGCAATMGGGAAWTWCGTTTGC
AGTAACATTACACAAAGTAGTAGTCGTGTGAAAAGAGGATTGTACAGAAAC
CTGCAAAGTAGGTAACACCGGCWCCGCAAAGACGCCGAATAGCATGGAGA
TTACTTCTTCTACTACATAAGGACGCACACTTTAGACGTGTCTTGGAGAAC
AAAGCACAGATCGATCAACGGGTCATCCCTGGGTGCATGAGGGGTGGCATG
GTCGCCGGAKTGCGTCCTTGCCTCTCCATGTTGGCGTGCCATCCTGCATGCA
GAGGTTTCATGTGCGCGGTTAGCACATAACTAATCCAATTAGGTTACATATAT
AGACATATAGAGAGATAACATTAGCAGTAGGTGCGCACCGAGGTTTCATGTC
GAAGCCCCCTCTTCTTGAGCTCGCGGTACTCCTGGCAGAGCGCGCAGGGCTC
GCAGCACCAAGTGGATGCAGCAGTCGGCGCAGGGGCTCTCCTGCAGGCCGTA
GTGCGCGCGCATCTTGGAGCGGTAGAAGCAGGAGTAGACGCACTGGCAGCC
GGTGAGCAGCATGATGAGCGCGTAGAGCGCGCCGCTCGCCCCGYACGACGT
CGACCCGCGGTCGATGATCTCCCGCCACCTGCCCCGAACGTGATGCACGGG
CACAGGGYACKTGATGCAGCAKTTGYCCGCAGTCGTCTGAAGCMRTCGCACA
AKAT

>Triticum-13|Triticum|Pehlivan

GACAAGCCTCTCATTACGCAAATGAAAAAMAAGGCAATTGGTTTGCARGAC
ATTAACAAAGTAGGAGTTTAAAGGTAAAGAGAATWGTACAGAAACCTGCA
AGTAGGTCWTCCCGGCACCGCRAGACGCCGAATAGCATGGAGATTACTTCT
TCTACTACATAAGGACGCACWCTTTARACCTGTCTTGGAGAAACKAWGCACA
SATCGATCAACCGGTCATCCCTGGGTGCCTGAGGGGWGGCATGGYCSCCGG
AGTGSgtCCTTGCCTCTCCMTGTTGGCSTGYCATCCTGCATGCRKAGGTTTCW
TGTCRCKGTTAYACATAACTAATCCARTTWGGTTACRTATATAGACRTAT
MGAGAGATTACATTAGCAGTAKGTGCGKACCRAGGTTTCATGTCRAAGCCCC
TCTTCTTGAGCTCKCGGTACTCCTGGSWASCGCGCAKGGCTCGCAGCACCAG
TGGATGCAGCATTCTGCGCAGGGGCTCTCCTGCAKGCCGTTTATGTGCGCAT
CTTGKAGCGYTCCAAGCAGGACTAYACGCACTGGTGCCGGTGAAAGTATGT
TGAGCGCGCGAGCYMYWCGCTT

>Triticum-14|Triticum|Guadalupe

ACTCGMMTKRSAACATKWMRTTCTTAGATCAAAAGGGAAAATACGTTTG
CARKAACATTACACAAAGKAGTAGKCGTGTGTTACGCAGGATTGTACAGAA
ACCTGCAAAGTAGGTAACACCGGCACCGCAAAGACGCCGAATAGCATGGA
GATTACTTCTTCTACTACATAAGGACGCACACTTTARACGTGTCTTGGAGAA
CAAAAGCACASATCGATCAACGGGTCATCCCTGGGTGCATGAGGGGTGGCA
TGGTCKCKGAGTGCGTCCTTGCCTCTCCATGTTGGCGTGCCATCCTGCATG
CRGAGGTTTCATGTGCGCGGTTAGCACATAACTAATCCAATTAGGTTACATAT
ATAGACATATAGAGAGATAACATTAGCAGTAKGTGCGCACCRAGGTTTCATG
TCGAAGCCCCCTCTTCTTGAGCTCGCGGTACTCCTGGSAGAGCGCGCAKGGCT
CGCAGCACCAKTGGATGCAGYAGTCKGCGCAAGGGCTCTCCTGCAGGCCGT
AGTGYGCGCGCATCTTGGAGCGGTAGAAGCAGGAGTAGACGCACTGGCAG
CCGGTGAGCAGCATGATGAGCGCGTAGAGCGMGCCGCTCGCCCGCACGAC
GTCGACCYGGGTCGATGATCTCCGCCACCTGCYCSAACGTGATGCAYGGGC
ACWGCMWCRTGATGCAGCWGTTGCCKCATWCGWCGAARMARATSSWMM

MAGRTWT

>Triticum-15|Triticum|Cumhuriyet - 75

GATGTTATAAGGGCTCTCCACCTCTCCATTTAGGCCACCCCCAAGCTTTACA
CTTATGCTTCCGCTTCGTATTGTGTGTGAATGTGAGGCGGATAACAAATTTC
ACACAGGAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTTAGGTGACACT
ATAGAATACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTC
GACCTGCAGGCGGCCGCACTAGTGATTCCCTTATCCTCTTCTCCTCTTAATAT
AAAAAATACGCATACTCATGCATATTCTAGATAAAAAAGGGAAAATACGTT
TGCAGTAACATTACACAAAGTAGTAGTCGTGTGTTACACAGTATTGTACAG
AAACCTGCAAAGTAGGTAACACCGGCACCGCAAAGACGCCGAATAGCATG
GAGATTACTTCTTCTACTACATAAGGACGCACACTTTAGACGTGTCTTGAG
AACAAAAGCACAGATCGATCAACGGGTTCATCCCTGGGTGCATGAGGGGTGG
CATGGTCGCCGGAGTGCGTCCTTGCCCTCTCCATGTTGGCGTGCCATCCTGCA
TGCAGAGGTTTCATGTCGCCGGTTAGCACATAACTAATCCAATTAGGTTACAT
ATATAGACATATAGAGAGATAACATTAGCAGTAGGTGCGCACCGAGGTTCA
TGTCGAAGCCCCCTCTTCTTGAGCTCGCGGTACTCCTGGCAGAGCGCGCAGGG
CTCGCAGCACCAAGTGGATGCAGCAGTCGGCGCAGGGGCTCTCCTGCAGGCC
GTAGTGCGCGCGCATCTTGAGCGGTAGAAGCAGGAGTAGACGCACTGGCA
GCCGGTGAGCAGCATGATGAGCGCGTAGAGCGCGCCGCTCGCCCCGCACGA
CGTCGACCCGCGGTTCGATGATCTCCGCCACCTGCCCGAACGTGATGCACGG
GCACAGGCACGTGATGCAGCAGTTGCCGCAGTCGTCGAAGCAGTCGCACAA
TCCCGCGGCCATGGCGGCCGGAGCTCACTGAAAAAAAAAAAAATCCTGGGGG
TCCG

>Triticum-16|Triticum|Ziyabey - 98

TACAAAMCSSSYCCTCTCKMWMASATAAAMAAAMGGCAAATASGTTTG
CARTAACATTACACAAAGTAGTAGTTTTGAGTTACACAGTATTGTACAGAA
ACCTGCAAAGTAGGTAACACCGGCACCGCAAAGACGCCGAATAGCATGGA
GATTACTTCTTCTACTACATAAGGACGCACACTTTAGACGTGTCTTGAGAA
CAAAAGCACAGATCGATCAACGGGTTCATCCCTGGGTGCATGAGGGGTGGCA
TGGTCGCCGGAGTGCGTCCTTGCCCTCTCCATGTTGGCGTGCCATCCTGCATG
CRGAGGTTTCATGTCGCCGGTTAGCACATAACTAATCCAATTAGGTTACATAT
ATAGACATATAGAGAGATAACATTAGCAGTAGGTGCGCACCGAGGTTTCATG
TCGAAGCCCCCTCTTCTTGAGCTCGCGGTACTCCTGGCAGAGCGCGCAKGGCT
CGCAGCACCAAGTGGATGCAGCAGTCGGCGCARGGGCTCTCCTGCAGGCCGT
AKTGCGCGCGCATCTTGAGCGGTAGAAGCAGGAGTAGACGCACTGGCAGC
CGGTGAGCAGCATGATGAGCGCGTAGAGCGCGCCGCTCGCCCCGCACGACG
TCGACCCGCGGTTCGATGATCTCCGCCACCTGCCCGAACGTGATGCACGGGC
ACARGCACGTGATGCAGCAGTTGCCGCAGTCGTCGAAGCARTCGCACA

>Triticum-17|Triticum|Bayraktar

GAAAAAAGGGKCGMAMTCCGAAAAACGTAAAMACTTYGYAAWTRKGTAY
GGAAGACATTAACACTGWAGGTGTTTAAAGAAAAAAGAAGTGACAGAAA
CCTGCAAAGTAAGTCATTCCGGCACCGCAAAGACKCCGAATAGCATGGAGA
TACTTCTTCTACTACATAAGGACGCACACTTTAGACGTGTCTTGSAACA
AAAGCACAGATCGATCAACGGGTTCATCCCTGGGTGCATGTGAGGTGGCATG
GTCGCCGGAGTGCGTCCTTGCCCTCTCCATGTTGGSGTGCCMTCTGCTGCR

GAGGTTTCATGTCRCCGGTTAGTACATAACTAATCCAATTAGGTTACATATWT
 AGACRTATAGAGAGATWACATTWGCAGKAKGTGCGCACCGMGTTTCATGT
 CRAAGCCCCTCTTCTTGAGCTCKCGGWACTCCTGGSARAGCGCGCAKGGCT
 CGYWGCACCAKTGGATGTAKCAGTCGGCGCARGGGCTCTCCTGCAGGCCGT
 ATTGYGCGCGCATCTTGGAGTGGTAGAAGCAGGAGTAGACKCACTGGSAGC
 CGGTGAGCAGYATGATGAGCGCGTTGGCGCGCCGCTCGTCCCGCACGACGT
 CKACCCGCGGTTCGATGATCTCCGCCCCCTGCCCSAACGTGATGCACGGGCAC
 AGGCACTGATGCAGCAGTTTCCCGCAKTCGTCTGAAGCAGTCGCCACAAGK
 C

>Triticum-18|Triticum|Basribey - 95

GGGTGATGCTCTGCAGTCGACGGGGCCCGGGATCCGATTCCCTTATCCTCTTC
 TCCTCTTAATATAAAAATACGCATACTCATGCATATTCTAGATAAAAAAAGG
 GAAAATACGTTTGCAGTAACATTACACAAAGTAGTAGTCGTGCGTTACACA
 GTATTGTACAGAAACCTGCAAAGTAGGTAACACCGGCACCGCAAAGACGCC
 GAATAGCATGGAGATTACTTCTTCTACTACATAAGGACGCACACTTTAGACG
 TGTCTTGGAGAACAAAAGCACAGATCGATCAACGGGTTCATCCCTGGGTGCA
 TGAGGGGTGGCATGGTCGCCGGAGTGCGTCCTTGCCCTCTCCATGTTGGCGTG
 CCATCCTGCATGCAGAGGTTTCATGTCGCCGGTTAGCACATAACTAATCCAAT
 TAGGTTACATATATAGACATATAGAGAGATAACATTAGCAGTAGGTGCGCA
 CCGAGGTTTCATGTCGAAGCCCCTCTTCTTGAGCTCGCGGTACTCCTGGCAGA
 GCGCGCAGGGCTCGCAGCACCAAGTGGATGCGGCAGTCGGCGCAGGGGCTCC
 CCTGCAGGCCGTAGTGCGCGCGCATCTTGGAGCGGTAGAAGCAGGAGTAGA
 CGCACTGGCAGCCGGTGAGCAGCATGATGAGCGCGTAGAGCGCGCCGCTCG
 CCCCCGACGACGTTCGACCCGCGGTTCGATGATCTCCGCCACCTGCCCGAACG
 TGATGCACGGGCACAGGCACGTGATGCAGCAGTTGCCGCA

>Triticum-19|Triticum|Gerek - 79

GTGGATAGATGCTCTGCAGTCGACGGGGCCCGGGACCGATTCCCTTATCCTCT
 TCTCCTCTTAATATAAAAATACGCATACTCATGCATATTCTAGATAAAAAA
 GGGAAAATACGTTTGCAGTAACATTACACAAAGTAGTAGTCGTGTGTTACA
 CAGTATTGTGCAGAAACCTGCAAAGTAGGTAACACCGGCACCGCAAAGACG
 CCGAATAGCATGGAGATTACTTCTTCTACTACATAAGGACGCACACTTTAGA
 CGTGTCTTGGAGAACAAAAGCACAGATCGATCAACGGGTTCATCCCTGGGTG
 CATGAGGGGTGGCATGGTCGCCGGAGTGCGTCCTTGCCCTCTCCATGTTGGCG
 TGCCATCCTGCATGCAGAGGTTTCATGTCGCCGGTTAGCACATAACTAATCCA
 ATTAGGTTACATATATAGACATATAGAGAGATAACATTAGCAGTAGGTGCG
 CACCGAGGTTTCATGTCGAAGCCCCTCTTCTTGAGCTCGCGGTACTCCTGGCA
 GAGCGCGCAGGGCTCGCAGCACCAAGTGGATGCAGCAGTCGGCGCAGGGGC
 TCTCCTGCAGGCCGTAGTGCGCGCGCATCTTGGAGCGGTAGAAGCAGGAGT
 AGACGCACTGGCAGCCGGTGAGCAGCATGATGAGCGCGTAGAGCGCGCCG
 CTCGCCCCGCACGACGTTCGACCCGCGGTTCGATGATCTCCGCCACCTGCCCGA
 ACGTAATGCACGGGCACAGGCACGTGATGCAGCAGTTGCCGCAGTCGTCTGA
 AGCAGTCGCACAAATCTAGATGCATTGCGGAGGTACCGAGCTCGAATTCAC
 TGGCCGTCGTTTTACAACGTCGT

>Triticum-20|Triticum|Sultan - 95

CTTAGASCSAACTTMTCTYKWCAMCATAAAAAAMGGCAAATASGTTTGCAR
TAACATTACACAAAGKAGKAGTCGTGTGAAACAAAGWATTGTACASAAAC
CTGYMAAGTAGGTAAACACCGGCACCGCAAAGACGCCGAATAGSATGGAGA
TACTTCTTCTACTACATAAGGACGCACACTTTARACGTGTCTTGGAGAACAA
AAAGCACASATCGATCAACGGGTTCATCCCTGGGTGCATGAGGGGTGGCATG
GTCGCCGGAGTGSCTCCTTGCCTCTCCATGTTGGSSTGCCATCCTGCATGCRK
AGGTTCATGTGCGCCGGTTAGCACATAACTAATCCAATTAGGTTACATATATA
GACATATAGAGAGATAACATTWGCAGTAGGTGCGCACCRAGGTTTCATGTCR
AAGCCCCTCTTCTTGAGCTCGCGGWACTCCTGGSAGAGCGCGYAGGGCTCG
CAGCACCAKTGGATGCAGYAKTCGGCGCARGGGCTCTCCTGCAGGCCGTAG
TGCGCGCGCATCTTGGAGCGGTAGAAGCAGGAGTAGACGCWCTGGCAGCC
GGTGAGCAGCATGATGAGCGCGTAGAGCGCGCCGCTCGYCCCGCACGACKT
CKACCKCGGTGCATGATCTCCGCCACCTGCCCSAACKTGATGCACGGGCA
CARKGCACKTGATGCASCWWTGCGCGCAKTCGTGCAARCAGTCRCACAAA
GA

>Triticum-21|Triticum|Kıraç - 66

TCCTACTCATGCTATTCTAGATAAAAAGGGAAATACGTTTGCAGTAACATTA
CACAAAGTAGTAGTCGTGTGTTACACAGTATTGTACAGAAACCTGCAAAGT
AGGTAACACCGGCACCGCAAAGACGCCGAATAGCATGGAGATTACTTCTTC
TACTACATAAGGACGCACACTTTAGACGTGTCTTGGAGAACAAAAGCACAG
ATCGATCAACGGGTTCATCCCTGGGTGCATGAGGGGTGGCATGGTCGCCGGA
GTGCGTCCTTGCCTCTCCATGTTGGCGTGCCATCCTGCATGCAGAGGTTTCAT
GTCGCCGGTTAGCACATAACTAATCCAATTAGGTTACATATATAGACATATA
GAGAGATAACATTAGCAGTAGGTGCGCACCGAGGTTTCATGTGCAAGCCCCT
CTTCTTGAGCTCGCGGTACTCCTGGCAGAGCGCGCAGGGCTCGCAGCACCA
GTGGATGCAGCAGTCGGCGCAGGGGCTCTCCTGCAGGCCGTAGTGCGCGCG
CATCTTGGAGCGGTAGAAGCAGGAGTAGACGCACTGGCAGCCGGTGAGCA
GCATGATGAGCGCGTAGAGCGCGCCGCTCGCCCCGCACGACGTGACCCGC
GGTCGATGATCTCCGCCACCTGCCCGAACGTGATGCACGGGCACAGGCACG
TGATGCAGCAGTTGCCCGCAGTCGTGCAAGCAGTCGCACAAATCTAGATGCA
TTCGCGAGGTACCGAGCTCGAATTCCTGGGCCGTGTTTTACAACGTGCTG
ACTGGGAAAAACCCTGGCGTACCCACTAATCGCCTTGACAGCACATTCCCCCT
TTCGACAGCTGGCGTTATAGCGAGAGCCCGGCACGATCGCCTCCTACCAGTG
CCAGCCTGAATGGGCGATTGGAAAAGTCTGGTCA

>Triticum-22|Triticum|gün - 91

GCAGAAGGGCGGTCCAATTTGMAATMTTGGAAATRSGTTTGCWGTAACAT
TACACAAAGTAKAGYCCTGTTCTACGAAGMATTGTACAGAAACCTGCAAAG
TAGGTAACACCGGCACCGCAAAGACGCCGAATAGCATGGAGATTACTTCTT
CTACTACATAAGGACGCACACTTTAGACGTGTCTTGGAGAACAAAAGCACA
KATCGATCAACGGGTTCATCCCTGGGTGCATGAGGGGTGGCATGGTCGCCGG
AGTGCGTCCTTGCCTCTCCATGTTGGCGTGCCATCCTGCATGCWGAGGTTT
WTGTGCCCGGTTAGCACATAACTAATCCAATTAGGTTACATATATAGACAT
ATAGAGAGATAACATTAGCAGTAGGTGCGCACCGAGGTTTCATGTGCAAGCC
CCTCTTCTTGAGCTCGCGKTAATCCTGGCARAGCGCGCAGGGCTCGCAGCAC
CAGTGGATGCAGCAGTCGGCGCAKGGGCTCTCCTGCAGGCCGTASTGCGCG

CGCATCTTGGAGCGGTAGAAAGCAMGAGTAGACGCACTGGCAGCCGGKTGA
GCASYATGATGAGCGCGTKAGCGCGCCGCTCGCCCCGCACKACKYCRACC
CGCGGYCRATGATCTCCC

>Triticum-23|Triticum|Kate A – 1

TACCATTCTCATGCATATTCTAGATAAAAAAGGGAAATACGTTTGCAGTAAC
ATTACACAAAGTAGTAGTCGTGTGTCACACAGTATTGTACAGAAACCTGCA
AAGTAGGTAACACCGGCACCGCAAAGACGCCGAATAGCATGGAGATTACTT
CTTCTACTACATAAGGACGCACACTTTAGACGTGTCTTGGAGAACAAAAGC
ACAGATCGATCAACGGGTCATCCCTGGGTGCATGAGGGGTGGCATGGTCGC
TGGAGTGCGTCCTTGCCTCTCCATGTTGGCGTGCCATCCTGCATGCAGAGGT
TCATGTGCGCCGGTTAGCACATAACTAATCCAATTAGGTTACATATATAGACA
TATAGAGAGATAACATTAGCAGTAGGTGCGCACCGAGGTTTCATGTCGAAGC
CCCTCTTCTTGAGCTCGCGGTACTCCTGGCAGAGCGCGCAGGGGCTCGCAGCA
CCAGTGGATGCAGCAGTCGGCGCAGGGGCTCTCCTGCAGGCCGTAGTGCGC
GCGCATCTTGGAGCGGTAGAAAGCAGGAGTAGACGCACTGGCAGCCGGTGA
GCAGCATGATGAGCGCGTAGAGCGCGCCGCTCGCCCCGCACGACGTGACCG
CGCGGTCGATGATCTCCGCCACCTGCCCCGAACGTGATGCACGGGCACAGGC
ACGTGATGCAGCAGTTGCCGCAGTCGTGCAAGCAGTCGCACAAATCTAGAT
GCATTCGCGAGGTACCGAGCTCGAATTCCTGGCCGTCGTTTTACAACGTCG
TGACTGGGAAACCCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTGCAGCACATCCCC
CTTTCGCCAGCTGGCGTTATAGCGAGAGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAAC
AGTTGCGCAGCTGGATGGCGAATGGAAATTGTAGCGTTCAATGTGTCATT
GCGTTGATTTGTAATTCAC