

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTRAKNOZA DAYANIKLILIK GENLERİNE
BAĞLI MOLEKÜLER MARKIRLARIN TÜRKİYE
NOHUT (*Cicer arietinum* L.) GENOTİPLERİNDE
TEST EDİLMESİ

Hasibe CİNGİLLİ
DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

GEBZE

2003

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTRAKNOZA DAYANIKLILIK GENLERİNE
BAĞLI MOLEKÜLER MARKIRLARIN TÜRKİYE
NOHUT (*Cicer arietinum* L.) GENOTİPLERİNDE
TEST EDİLMESİ

Hasibe CİNGİLLİ
DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Abdülkadir AKÇİN

GEBZE
2003

ÖZET

Çalışmada, nohutta *Ascochyta blight* hastalığına karşı direnç ile ilgili moleküler markırların (RAPD, STMS, ISSR) kullanılması ve test edilmesi amaçlandı. Genetik ve fizyolojik çalışmalarda biyoteknolojik yöntemlerin uygulanması ve önemli bir ürün olmasından dolayı nohut iyi bir model olduğu için tercih edildi. Aynı zamanda nohutta ıslah metodları tanımlandı. Bunun için antraknoza dirençli ve hassas olan nohut genotipleri üzerinde testler yapıldı. 20 antraknoza hassas ve 27 antraknoza dirençli olan nohut genotipi (*C. arietinum* L.) genomik DNA kaynağı olarak kullanıldı. Ve kontrol için 1 hassas ebeveyn hattı PI 599072 ve 1 dirençli ebeveyn hattı FLIP 84-92C (3) kullanılarak toplam 49 örnek üzerinde, nohut genom haritasında yerleri belirlenmiş olan antraknoza direnç geni ile ilişkili RAPD, STMS, ve ISSR markırlarından oluşan 10 moleküler markır en az ikişer defa olmak üzere gözlemler yapılarak test edildi. Kullanılan markırlardan UBC733 RAPD markırı ile TA2 STMS markırı *Ascochyta blight*'a dirençliliğe özgü markır olarak ıslah çalışmalarında markır yardımcı seçim maksadıyla kullanılabileceği sonucuna varıldı. RAPD ve STMS teknolojiler, son zamanlarda markır yardımcı seçim amacıyla ıslah programlarında faydalı olmaktadır. Bu markırlar, özellikle de UBC733 adlı RAPD markırı ve TA2 STMS markırı ıslah programlarında istenilen karakterleri taşıyan genotipleri seçmek için kullanılacaktır. Moleküler markırlar, nohutta *Ascochyta blight*'a direnci tanımlayan gen ile direkt ilişkilidir. Çalışmada, biyoteknolojik yöntemler kullanılarak Türkiye de varolan özellikle de nohut üretimini sınırlayan biyotik stres faktörlerinden *Ascochyta blight* hastalığına karşı tarla ortamına ekim yapılmasına gerek kalmaksızın laboratuvar şartlarında hassas ve dirençli olan nohut genotiplerini test etmek amaçlandı. Türkiye nohut genotiplerinde bu markırların varlığının gösterilmesi ve dirençli genin izolasyonunun sağlanması bundan sonraki ıslah çalışmalarında dayanıklılık genlerinin takibini ve istenen genotiplere aktarılmasını kolaylaştıracaktır. Antraknoza dayanıklılığı kontrol eden genlerin nohut genom haritasında yerlerinin belirlenerek genlerin izolasyonu için gerekli ilk aşamanın aşılması ve hastalığa direncin tayin edilmesi sağlanacaktır.

SUMMARY

Just as efficient marker-assisted selection strategies used in world-wide plant improvement programs have been developing, so too has molecular marker technology, especially during the last decade. This article is, therefore, aimed at testing the reliability of molecular markers in showing whether a certain kind of pulse is resistant to *Ascochyta* blight, one of the biotic stress factors. In this article, chickpea has been chosen as the kind of pulse to be analyzed not only because it is an important crop species, but also because it serves as a good model for genetic and physiological studies designed to devise more efficient breeding methods. This research deals with two divergent chickpea lines, one of which is resistant and the other is susceptible to *Ascochyta* blight. These lines were used in the isolation of the genomic DNA's of each of the 47 chickpeas (*C. arietinum* L.). 20 of these specimens included in the susceptible line and 27 in the resistant one. There was also one control of the susceptible parental line (PI 599072) and one of the resistant parental line (FLIP 84-92C[3]). Each of the 49 specimens was tested twice by means of ten molecular markers of RAPD, STMS and ISSR, which are located in the chickpea genome map and related to the anthracnose resistance gene. Of these 10 markers, UBC733 RAPD and TA2 STMS were found to be linked to *Ascochyta* blight-resistant chickpea lines. It was, therefore, concluded that these two markers may play a significant role in the development of current chickpea breeding programs, and that marker-assisted selection is a reliable and efficient method of finding out resistant genes in this kind of pulse.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

SAYFA

ÖZET

SUMMARY

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

SİMGELER VE KISALTMALAR

ŞEKİLLER DİZİNİ

TABLolar DİZİNİ

1. GİRİŞ

2. KONUS İLE İLGİLİ YAYIN VE ÇALIŞMALAR

2.1. Nohutun kökeni, Tarihçesi ve Coğrafi Dağılışı

2.1.1. Kökeni

2.1.2. Tarihçesi

2.1.3. Coğrafi Dağılışı

2.1.4. Türkiye de Nohut Populasyonu

2.2. Nohutun Filogenisi, Sistematığı ve Sitolojisi

2.3. Nohut Patolojisi

2.4. Nohutta Hastalığa Direnç Gelişmesi

SAYFA**2.5. Nohutun Genetik Gelişimi****2.6. Direnç Mekanizması****2.6.1. Markır Yardımlı Seçim ve Bitki Hastalık Direnci****2.6.2. Direnç için Islah****2.7. Moleküler Markır (Genetik Markır)****2.7.1. Markır Tipleri****2.7.1.1. Morfolojik Markırlar****2.7.1.2. İzoenzim****2.7.1.3. Restriksiyon Fragment Length Polymorphism (RFLP)****2.7.1.4. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)****2.7.1.5. Sequenced Characterised Amplified Region (SCAR)****2.7.1.6. ASAP****2.7.1.7. SPAR****2.7.1.8. Amplified fragment Length Polymorphism (AFLP)****2.7.1.9. STMS (Mikrosatellit)****2.7.1.10. Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS)****2.8. RAPD Teknolojisi****2.9. ISSR-PCR****2.10. Mikrosatellit (STMS) Markırlar ile Moleküler Islah****2.11. Genom Haritalama****2.12. Gen Etiketleme****2.13. Gen Piramidinin Oluşması****2.14. Biyoteknolojik Çalışmalar****2.14.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu****2.14.2. Gen Teknolojisi**

SAYFA**3. LABORATUVAR İŞLEMLERİ****3.1. MATERYAL**

3.1.1. Bitki Materyali

3.1.2. Moleküler Materyal

3.2. METOD

3.2.1. Genomik DNA İzolasyonu

3.2.1.1. Miniprep Tekniği

3.2.1.2. Mikroprep Tekniği

3.2.2. İzole Edilen DNA Konsantrasyonlarının Tayini

3.2.2.1. Agaroz Jel Elektroforez (Kalite Jeli)

3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

3.2.3.1. PCR Amplifikasyonu ve RAPD Analizi
ile Genom Parmak İzlerinin Çıkarılması

3.2.3.2. PCR Amplifikasyonu ve ISSR Analizi
ile Genom Parmak İzlerinin Çıkarılması

3.2.3.3. PCR Amplifikasyonu ve STMS Analizi
ile Genom Parmak İzlerinin Çıkarılması

4. BULGULAR

4.1. DNA İzolasyon Metodunun Belirlenmesi

4.2. PCR Koşullarının Optimizasyonu

4.3. Nohut Genotiplerinin Genomik Parmakizinin Çıkarılması

4.3.1. RAPD, ISSR ve STMS Markır Sonuçlarının Değerlendirilmesi

4.3.1.1. PCR ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi

4.3.1.2. RAPD, ISSR ve STMS Bant Profilleri

SAYFA**5. TARTIŞMALAR**

5.1. DNA İzolasyon Yönteminin Belirlenmesi

5.2. Uygun Genetik Markırın Seçilmesi

5.3. RAPD, ISSR ve STMS Markır Sonuçlarının Değerlendirilmesi

6. SONUÇLAR**KAYNAKLAR****EKLER****ÖZGEÇMİŞ**

SİMGELER VE KISALTMALAR

SİMGELER

AÇIKLAMA

AFLP	:Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphisms)
AP-PCR	:Rastgele Primerli Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction)
BAC	:Bacterial Artificial Chromosome
bç=bp	:Baz çifti
°C	:Santigrad Derece
cM	:Santimorgan
CA	:Sitozin Adenin bazları
CAPS	:Kesilmiş Çoğaltılmış Polimorfik Diziler (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)
cDNA	:Kopya DNA
CsCl	:Sezyum klorür
CTAB	:Etiltrimetilammonium bromid
DAF	:DNA Çoğaltılmış Parmakizi (DNA Amplification Fingerprinting)
DNA	:Deoksiribonükleik Asit
dNTP	:Deoksiribonükleotidtrifosfat
E	:Enzim
EDTA	:Etilendiamintetraasetik asit
GA	:Guanin Adenin bazları
GAA	:Glasiel Asetik Asit
G+C	:Guanin + Sitozin
GYTE	:Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü
H ₂ O	:Su

ICARDA	:International Centre for Agricultural Research in the Dry Areas
ICRISAT	:International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics
Kb	:Kilobaz
KCl	:Potasyum klorür
L	:Litre
MAS	:Markıra-dayalı seleksiyon (Markır-Assisted Selection)
Mb	:DNA sarmalında 1000.000 baz çifti uzunluğu
mM	:Milimolar
ml	:Mililitre
MgCl ₂	:Magnezyum klorür
mg	:Miligram
µl	:Mikrolitre
µM	:Mikromolar
n	:Amplifikasyondaki döngü sayısı
NaCl	:Sodyum klorür
Ng	:Nanogram
P ₁	:Primer I
PAGE	:Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Polyacrilamide Gel Electrophoresis)
PCR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
pH	:Hidrojen İyon Konsantrasyonu
PVP	:Polivinilpirolidan
QTL	:Quantitative Trait Loci
RAPD	:Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA)
RFLP	:Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Lenght Polymorphisms)
RIL	:Recombinant Inbred Line
RNase	:Ribonükleaz
rpm	:Dakikada dönme sayısı (rotation per minute)

SDS	:Sodium Dodecyl Sulfate
Sn	:saniye
SCAR	:Sequenced Characterised Amplified Region
SSCP	:Tek-Zincirli Konformasyon Polimorfizmi (Single-Strand Conformation Polymorphism)
SSLP	:Basit Dizi Uzunluk Polimorfizmi (Simple Sequence Length Polymorphisms)
SSR	:Basit Dizi Tekrarlamaları (Simple Sequence Repeat)
STR	:Basit birbirinin arkasına dizilmiş tekrarlar (Simple Tandem Repeat)
STMS	:Sequence-Tagged Microsatellite Site (Mikrosatellit)
STS	:Sequence-Tagged Site
TAE	:Tris Asetat
TE	:Tris EDTA
Tris-HCl	:Tris hidroklorik asit
U.V.	:Ultraviyole
U.	:ünite
V.	:Volt

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL

SAYFA

Şekil 2.1. Nohut antraknozu

Şekil 2.2. Nohut Genom Haritası

Şekil 2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Şekil 3.1. Kalite Jeli

Şekil 4.1. UBC733 primeri kullanılarak nohut genotiplerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri. M. Ladder, C. Kontrol, R: Antraknoza dirençli nohut genotipi, S: Antraknoza hassas nohut genotipi, RP: Antraknoza dirençli ebeveyn hattı [FLIP 84-92C (3)], SP: Antraknoza hassas ebeveyn hattı (PI 599072).

Şekil 4.2. UBC681 primeri kullanılarak nohut genotiplerinden DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri. M. Markır, C. Kontrol, R: Antraknoza dirençli nohut genotipi, S: Antraknoza hassas nohut genotipi, RP: Antraknoza dirençli ebeveyn hattı [FLIP 84-92C (3)], SP: Antraknoza hassas ebeveyn hattı (PI 599072).

Şekil 4.3. UBC681 primeri kullanılarak nohut genotiplerinden DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izlerinin %2'lik agaroz jelde gözlenmesi. M. Markır, C. Kontrol, R: Antraknoza dirençli nohut genotipi, S: Antraknoza hassas nohut genotipi, RP: Antraknoza dirençli ebeveyn hattı [FLIP 84-92C (3)], SP: Antraknoza hassas ebeveyn hattı (PI 599072).

Şekil 4.4. UBC836 (ISSR) primeri ile çoğaltılmış nohut genotiplerinin %2'lik agaroz jelde gözlenen genomik parmak izleri. M. Markır, C. Kontrol, R: Antraknoza dirençli nohut genotipi, S: Antraknoza hassas nohut genotipi, RP: Antraknoza dirençli ebeveyn hattı [FLIP84-92C (3)], SP: Antraknoza hassas ebeveyn hattı (PI 599072).

Şekil 4.5. GA2 (STMS) primeri kullanılarak nohut genotipine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu oluşan ürünlerin %2'lik agaroz jelde gözlenen genomik parmak izi profili. M. Markır, C. Kontrol, R: Antraknoza dirençli nohut genotipi, S: Antraknoza hassas nohut genotipi, RP: Antraknoza dirençli ebeveyn hattı [FLIP 84-92C (3)], SP: Antraknoza hassas ebeveyn hattı (PI 599072).

Şekil 4.6. TA2 (STMS) primeri kullanılarak nohut genotiplerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri. M. Markır, C. Kontrol, R: Antraknoza dirençli nohut genotipi, S: Antraknoza hassas nohut genotipi, RP: Antraknoza dirençli ebeveyn hattı [FLIP 84-92C (3)], SP: Antraknoza hassas ebeveyn hattı (PI 599072).

Şekil 4.7. TS54 primeri kullanılarak nohut ailesine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen STMS bant profili. M. Markır, C. Kontrol, R: Antraknoza dirençli nohut genotipi, S: Antraknoza hassas nohut genotipi, RP: Antraknoza dirençli ebeveyn hattı [FLIP 84-92C (3)], SP: Antraknoza hassas ebeveyn hattı (PI 599072).

Şekil 4.8. TS54 primeri kullanılarak nohut bireylerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen ve %2'lik agaroz jelde gözlenen STMS genomik parmak izi (bant profili). M. Markır, C. Kontrol, R: Antraknoza dirençli nohut genotipi, S: Antraknoza hassas nohut genotipi, RP: Antraknoza dirençli ebeveyn hattı [FLIP 84-92C (3)], SP: Antraknoza hassas ebeveyn hattı (PI 599072).

Şekil 4.9. TS54 primeri kullanılarak nohut ailesine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen STMS bant profili. M. Markır, C. Kontrol, R: Antraknoza dirençli nohut genotipi, S: Antraknoza hassas nohut genotipi, RP: Antraknoza dirençli ebeveyn hattı [FLIP 84-92C (3)], Antraknoza hassas ebeveyn hattı (PI 599072).

TABLÖLAR DİZİNİ

TABLO

SAYFA

3.1. Türkiye de *Ascochyta blight*'a hassas ve dirençli nohut genotipleri

3.2. Nohutta *Ascochyta blight*'a dirençten sorumlu olan genlerle ilgili mikrosatellit (STMS) markırlar

3.3. Nohutta *Ascochyta blight*'a dirençten sorumlu olan genlerle ilgili RAPD markırlar

3.4. Nohutta *Ascochyta blight*'a dirençten sorumlu olan genlerle ilgili ISSR markırlar

4.1. *Ascochyta blight*'a hassas ve dirençli olan nohut genotiplerinde markır - genotip ilişkisi

4.2. *Ascochyta blight*'a hassas ve dirençli olan nohut genotiplerinde dirençlilikle ilgili olan markırların (RAPD, ISSR ve STMS) test sonuçları

1. GİRİŞ

Nohut, (*Cicer arietinum* L.) kendi kendine döllen 16 kromozoma ($2n=16$) sahip diploid bir üründür. Nohut, fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) ve bezelyeden (*Pisum sativum* L.) sonra dünya da tüketilen baklagiller (*Leguminosae*) familyasına ait 3. önemli üründür (FAO,1996). İçerdiği protein miktarı açısından da insanlar tarafından en çok tüketilen ürün olmaktadır.

Leguminosae familyasına giren nohut (*Cicer*) yemeklik dane baklagil olarak adlandırılmaktadır. Yemeklik dane baklagiller, danelerinde ve diğer tüm bitki kısımlarında yüksek oranda protein içermeleri nedeniyle büyük öneme sahiptirler. Yemeklik baklagillerden nohut danelerinde %18 - %36 gibi yüksek orandaki protein miktarı ve bu proteinlerin vücutta sentezlenmeyen değerli aminoasitleri içermesi nedeniyle de beslenmede büyük önem taşımaktadır. Aynı zamanda özellikle A, B ve D vitaminlerince de zengindir. Nohudun ülkemizde 818.000 hektar ekim alanı ve 683.000 ton üretimi yapılmaktadır. Nohut, önemli bir besin olmasına rağmen ürün miktarı oldukça azdır. Bunun nedeni ise; *Fusarium wilt*, *Ascochyta blight* gibi biyotik zararlılara ve kuraklık, tuzluluk, aşırı nem gibi abiyotik stres faktörlerine karşı ürünün son derece hassas olmasıdır. Fakat bu zararlı etkenlerin en tehlikelisi ise nohut antraknozu denilen *Ascochyta blight* hastalığıdır. Bu hastalık, nemli havalarda etkili olduğu gibi infekte olmuş tohumlarla veya hastalıklı olan ilk ürünün hasadından sonra araziye yapılan yeni ekimlerde de kendini göstermektedir. Hastalık iri taneli olan ve en çok rağbet gören *kabuli* denilen nohut genotiplerinde daha yaygın olarak görülmektedir. Çünkü *kabuli* tipin besin yüzdesi daha fazla olduğundan mantar için uygun ortamı oluşturmaktadır. Oysa küçük taneli *desi* tipinde ise hastalık etkili değildir.

Dirençli türün ıslahı için; sulama veya patojenle nohudun muamele edilmesi yani hastalığın bulaşması ile ortaya çıkan hastalık epidemileri, hastalık bahçelerine nohut ekimi yapılarak gözlenir. Bu yaklaşımla, *Ascochyta blight*'a direnç geliştirmek için fazla zaman ve sabır isteyen, ulusal ve uluslararası ıslah programları

geliştirilmiştir. Bu nedenle daha etkili ıslah stratejileri ve seçim metodları geliştirmek gerekmektedir.

Nohut antraknozunun etmeni *Ascochyta rabiei* denilen bir mantardır. Hastalık etmeni, bitkinin toprakaltı organlarını infekte eder. Gövde, yaprak, çiçek ve baklalar (kapsüller) üzerinde kahverengiden siyaha kadar değişen renklerde lezyonlar meydana getirerek %10'dan %100'e varan oranlarda ürün kaybına neden olmaktadır (Nene, 1988 and Dolar, 1994).

WANA ülkelerinde, ürün geleneksel olarak ilkbahar aylarında yetiştirilir. Fakat, kışın ekimi yapıldığında %100'e ulaşan miktarda ürün artışı olmaktadır. Çiftçiler, bu durumu çok nadir olarak dikkate almaktadırlar. Çünkü, nemli ve yağışlı olan kış şartları hastalığın yayılmasında çok etkili olmaktadır (Saxena and Varma 1990). Bu ağır hava şartlarının üstesinden gelebilmek için, soğuga dayanıklı ve antraknoza dirençli kültürler elde edilmelidir. Geleneksel yollarla böyle hat ve çeşitleri ıslah etmek için çok sayıda uluslararası çabalar olmasına rağmen kültürler mantara karşı uzun süre direnç göstermemektedirler.

Bitki yetiştiriciliğinde karşılaşılan büyük zorluklardan biri hastalıklara karşı direncin sağlanmasıdır. Hastalıklara karşı direnç kantitatif bir özelliktir. Kantitatif özellikler, kalitatif özelliklerden bireylerin kesin bir şekilde sınıflandırılmaması sebebiyle farklılık göstermektedirler. Kantitatif özellikler sürekli bir varyasyon gösterdiğinden Mendel kuralları direkt olarak kullanılmamaktadır. Moleküler markırların kullanılmasıyla tüm bu zorlukların üstesinden gelinmiştir. Çünkü, moleküler markırlar dirençli kültürlerin gelişmesini sağlamaktadırlar. Markır yardımıyla seçim vasıtasıyla mantarın farklı türlerine karşı direnç gösteren birden çok genin biraraya getirilmesi amaçlanmaktadır. Fakat, bu yaklaşım direnç geni ile yakın ilişkili olan veya aynı lokusta bulunan markırlarla direnç geninin etiketlenmesi esasına dayanmaktadır.

Nohutta *Ascochyta blight* direnci komplekstir. Yapılan çalışmalara göre, nohutta *Ascochyta blight*'a direncin birden çok genin kontrolü altında olduğu isbatlanmıştır (Singh and Reddy, 1993; Tewari and Pandey, 1986; Muehlbauer et. al., 1990).

Son zamanlarda ise Tekeoğlu ve arkadaşları (2000) yılında yaptıkları çalışmayla tamamlayıcı iki resesif genin kontrolü altında direnç oluştuğunu göstermişlerdir. Fakat, direnci tanımlayan genlerin lokasyonları bilinmemektedir. Çünkü çoklu genler direnç durumunu göstermektedir. Bu genlerin genomik lokasyonlarının ve moleküler markırlarla bağlantısının bilinmesi gen transferini ve dirençli genlerin biraraya getirilmesiyle oluşturulan gen piramidinin oluşturulmasını ve markır yardımlı seçim vasıtasıyla dirençli kültürlerin ıslahını kolaylaştırmaktadır.

Moleküler markırlar, çok sayıda ürünün genom haritasını oluşturmak için kullanılmaktadır. Markırlar, özellikleri tanımlayan gen sayısını veya etiketlenecek gen miktarını tanımlamak için de kullanılmaktadır. Çok önemli olan hastalık direnç genleri, çeşitli ürünlerde etiketlenerek genom haritaları oluşturulmuştur. Çünkü genetik haritalar tarımsal önemi olan ürünler için son derece önem taşımaktadır. Bitki genetikçileri ve ıslahçılar ıslah etkinliğini geliştirmek için bu haritaları kullanmaktadırlar. Genetik haritaların pratik olarak kullanılmasının diğer önemi ise, genetik markırlarla birlikte harita sayesinde, harita da olan mevcut özelliğe özgü tek genin etiketlenmesini sağlamaktır.

Bitki ıslahında kullanılan ve çok geniş uygulama alanı olan moleküler markırların birçok tipi vardır. Bunlar, türler arasında genetik farklılığın tahmin edilmesi ve haritaya bağlı olan yani harita da bulunan ve tarımsal olarak önemi olan *Ascochyta blight*'a direnç geni gibi genlerin klonlanmasında ve genetik analizlerinin yapılmasında kullanılmaktadır.

Genetik harita; STMS, DAF, AFLP, ISSR, RAPD, SCAR ve izoenzim markırlarını içermektedir. Son zamanlarda nohutta *Ascochyta blight*'a direnci tanımlayan genler RAPD ve STMS markırlarıyla etiketlenmektedir (Mayer et. al., 1997; Ratnaparkhe et. al., 1998). Bu nedenle bu çalışmada STMS ve RAPD markırlarını kullanmak amaçlanmıştır. RAPD markırlar, basit ve hızlı sonuç vermesinin yanı sıra direnç geninin etiketlenmesi ve genom haritasının oluşturulmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikrosatellitler (STMS) nohut genom haritasında (TAA)_n, (GA)_n ve (CA)_n tekrarları şeklinde olup yaklaşık 60 kb. civarında 12.000 bölgeden daha çok bulunmaktadır (Hüttel et. al., 1999). Bir markır sistemi olarak mikrosatellitler, buğday gibi kendi kendine döllen ürünlerin genom

ve genetik analizinde kullanılabilmesi için yüksek potansiyele sahiptir. Çünkü bu ürünler yüksek polimorfizm derecelerine sahiptirler.

Bu çalışmada, nohutta *Ascochyta blight*'a direnç genetiğini tanımlamak ve moleküler markırlar kullanarak dirençliliğin test edilip antraknoza direnç geninin izolasyonu için moleküler markırların gerçekten dirençlilikle ilgili olup olmadığının test edilmesi amaçlanmaktadır. Ayrıca moleküler markırlar kullanarak uygun kromozomal bölgeleri etiketlemek, dirençli gen topluluğundan oluşan gen piramidini göstererek harita oluşumunu sağlamaktır. Yaygın olarak kullanılan moleküler markırlar nohutta sınırlı polimorfizm göstermiştir (Simon and Muehlbauer, 1997).

Nohut genom haritasında yeralan 5 RAPD (UBC733, UBC181, UBC836, UBC681, UBC858) markırı çalışılacaktır. Son yıllarda mikrosatellit diye adlandırılan ve yüksek polimorfik yapı gösteren yeni bir sınıf moleküler markır çeşidi ortaya çıkmıştır. Bu bağlamda proje; 1999 yılında Hüttel et.al., STMS markırlarına dayalı türe özgü nohut haritasının oluşturulmasına doğru ilk basamak olarak *C.arietinum* da polimorfik mikrosatellit dizilerinin ve 2000 yılında Dipak et.al. ise, nohutta *Ascochyta blight*'a dirençten sorumlu olan RAPD markırlarının belirlenmesiyle bu markırlar uygulamaya sokularak genin yerinin tayini ve izolasyonu açısından son basamağı Türkiye şartlarında gerçekleştirmeyi amaçlamaktadır.

Bu çalışmanın konusu, mikrosatellit ve RAPD markırlar yardımıyla direnç genlerinin (antraknoza direnç geni) genetik haritadaki durumunu tanımlamaktır. Ayrıca *Ascochyta blight*'a direnci tanımlayan genlerin çevresinde bulunan diğer genlerin haritadaki yoğunluğunu tesbit etmek, genetik harita yoğunluğunu artırmak, dirençli gen ile direkt ilişkili veya yakın ilişkide olan markırları tanımlamak için yüksek yoğunlukta genetik harita kullanabilmektir. Bazı markırlar, direnç geni ile aynı lokusta veya yakın lokusta bulunabilmektedirler. Ayrıca ilerde *Ascochyta blight*'a direnç genini izole etmek, nohut antraknozu denilen ve bir çeşit nohut hastalığı olan bu hastaalığa dirençli kültürlerin elde edilmesi için markır yardımıyla seçim etkinliğini tanımlamak; Nohut genomu, yüksek yoğunluğa sahip haritanın geliştirilmesi için temel olarak kullanılmaktadır. Böylece haritaya bağlı olarak direnç genlerinin klonlanması sağlanacaktır.

Agronomik özelliklerin nohut genom haritasında kantitatif özelliklerin bulunduğu bölgede bulunması ve markır yardımıyla seçimde kullanılması ve haritalanması son derece önemlidir. Aynı zamanda, genetik harita da bulunan STMS markırlarının dizisi de teyit edilmektedir, nohutta genom analizi için mikrosatellitlerin etkili olarak kullanımını tesbit edip kanıtlamak, genotipler arasındaki farklılığı göstermek, kültür ve yabani formları da içeren nohut germplazmındaki genetik farklılığı tahmin etmek son derece önemlidir. Ayrıca genetik harita oluşturmak için DNA markırlarının kullanımı, direnç genlerinin haritaya bağlı olarak klonlanması ve özellikle de mantara karşı direnç genleri için kullanılmaktadır. Bu çalışma nohut, fasulye ve bezelye gibi *Leguminosae* familyasına ait ürünlerde bulunan dirençli gen analoglarının izolasyonuna karşı direkt geliştirilen bir yaklaşımdır.

Baklagillerin genomlarının haritalanmasındaki ilk hedef, agronomik olarak önemli olan genlerin izolasyonunu sağlamaktır. Böyle önemli genlerin tanımı, izolasyonu ve karakterize edilmesinden sonra transformasyon teknikleri ile transgenik ürünler elde edilecektir. Nohut ıslahında pratik kullanım için, özellikle markır yardımcı seçim, *Ascochyta blight*'a direnç geni ile yakın ilişkili birkaç STMS markır önem taşımaktadır. Geniş bir germplazmda antraknoza direnç geninin ayrılmasının analizi için yüksek polimorfik özellik gösteren markırlardan en az birinin kullanılması gerekmektedir.

Çalışmada, *C. arietinum* da, daha önceden nohut genom haritasında varlığı isbatlanmış polimorfik mikrosatellit dizilerinin karakterize edilmesi ve test edilip seleksiyon etkinliğinin artırılmasındaki önemi rapor edilmektedir. Türlerarası genetik haritanın oluşturulmasına ilk basamak olarak STMS markırlarının kullanılması üzerinde ilk çalışma olacaktır. Ayrıca, nohut ırklarını, hastalığa karşı hassas mı veya dayanıklı mı olduğunu karakterize etmek için ve *C. arietinum* ile taksonomik ve filogenetik açıdan ilişkili olan *C. reticulatum* denilen yabani formun akrabalık derecesini oluşturduğu bant profili ile test etme amaçlanmaktadır. Bu maksatla, antraknoza hassas olan *C. reticulatum* formu kullanılmaktadır.

Nohut genom haritasında, önemli bir hedefte, ürün kaybına sebep olan hastalıklara karşı özellikle de fungal patojenlere (*Ascochyta rabiei*, *Fusarium oxysporium* vb.) karşı dirençli geni etiketleyip izolasyonunu sağlamaktır. Nohut genomunda mevcut ırka özgü direnç genlerinin kalıtımı ve genlerin lokasyonları, nohutta *Ascochyta blight*'a direncin genetik ve moleküler temelini anlamamıza yardımcı olmaktadır. Diğer ürünlerde bitki direnç genleri çoklu allelik seriler olarak lokalize olmuş şekilde görünmektedirler. Direnç genlerinin bulunduğu bölgenin tanımlanması ve haritalanması çok sayıda üründe; arpa (*Hordeum vulgare* L.) (Meyer et. al., 1996), mısır (*Zea mays* L.), yonca (*Linum ustitatissimum* L.), ve marul (*Lactuca sativa* L.) (Sharma and Mohapatra, 1996) gösterilmiştir.

Bu çalışmanın konuları RAPD markırlar ve mikrosatellitler yardımıyla direnç genlerinin genetik haritadaki durumlarını tanımlamaktır. Bu ilgili genlerin genetik yapısı üzerinde yapılan çalışmalar, nohutta antraknoza dirençli olan gen kümesini anlamamıza yardım etmektedir. Hastalığa dirençli olan gen kümeleri çok sayıda bitki türünde, direnç genlerinin veya bu genlerle ilişkili olan moleküler markırların segregasyon analizi için tanımlanmıştır (Michelmore and Meyers, 1998). Direnç geni ile ilişkili olan genlerin iyi yapılanmış genetik haritalanması *blight*'a karşı direnç genlerinin haritaya bağlı olarak klonlanması için bir vasıtaadır. Direnç genleri için kalıtım bilgisi, yabani türlerden kültür formlarına direnç genlerinin transfer edilmesini hedef alan ıslah programlarına ışık tutmaktadır.

Proje, son zamanlarda bezelye, mercimek ve nohut haritalarında çok sayıda markırın yereldiğini ve bunların genom analizinde çok faydalı olabileceğini ısbatlamaktadır. Moleküler markırlar sayesinde nohut yetiştiricileri ve ıslahçılar hastalığa dirençli olan bölgenin seçimini güven altına almış olacaklardır. Bu nedenle mevcut markırlar, tohum germinasyonu öncelikli olarak foliar enfeksiyona direnci ortaya çıkarmak için potansiyel olacaktır. Bu da dirençli genin izolasyonu için ilk basamak olup gelecekte biyoteknolojik olarak ışık tutan bir çalışma olacaktır. Yani ıslah programlarında markır yardımıyla seçim sayesinde dirençli germplazmların ayrımı, direnç geninin klonlanması, gen haritasının çıkarılmasında esaslı bir basamak teşkil edecektir.

2. KONU İLE İLGİLİ YAYINLAR VE ÇALIŞMALAR

2.1. NOHUTUN KÖKENİ, TARİHÇESİ VE COĞRAFİ DAĞILIŞI

2.1.1. KÖKENİ

DE CANDOLE (1959), nohutun kökeninin doğuda Yunanistan ile Himalayalar, Kuzey yarıküresinde Kırım ile Etiyopya arasında bulunduğunu belirtmektedir. Ayrıca, nohutun birkaç kökeni olduğuna değinmekte Güneybatı Asya ile Akdeniz bölgesini birinci derecede gen merkezi, Etiyopya'yı da ikinci derece gen merkezi olarak kabul etmektedir. Nohutun, Afrika'nın doğusuna dışarıdan geldiğini ve yüksek yörelerde yaygın olduğunu belirtmektedir (Singh et.al., 1990). Küçük taneli nohutlar için Doğu Akdeniz Bölgesi ve Etiyopya'yı, büyük taneli nohutlar için de Batı Akdeniz yöresini gen merkezi olarak belirtmektedir (Açıkgöz, 1994).

Nohut, Orta Doğu ve Uzak Doğu'da geniş ölçüde kullanılan en eski yemeklik dane baklagil türüdür. Özellikle Türkiye ve Suriye de kültür nohutlarına benzeyen yabani nohut türleri vardır. Ancak bunlar yaygın değildir. İran ve Afganistan'da yetişen yabani türler, kültür türlerinden birçok karakter ve yetiştirme özellikleri yönünden farklılıklar göstermektedirler (Van der Maesen, 1972).

Anadolu kökenli *C. pinnatifidum* Jaub. et Spach.'ın kültür nohutlarının atası olarak kabul edilebileceği açıklanmıştır. Ancak son yıllarda *C. echinospermum* P.H. Davis ve *C. bijugum* K.H. Rech türlerinin nohutun yabani formu olabileceği açıklanmıştır. Son olarak Güney Doğu Anadolu'da bulunan *C. reticulatum* türünün nohutun yabani formu olduğu belirtilmektedir (Singh and Ocampo, 1997).

2.1.2. TARİHÇESİ

Nohutun kültürü insanlık tarihi ile yakından ilişkilidir. Arkeolojik kazılarda sık sık zarar görmüş nohut taneleri bulunmuştur. Filistin’de bulunan ve M.Ö.4000 yıllarına ait oldukları saptanan nohut tanelerinin en eski örnekler olduğu belirtilmektedir (Singh, 1990). Buna rağmen nohutun kültüre alınışına ilişkin bilgiler günümüze kadar açıklık kazanmamıştır. Nohutun diğer yemeklik baklagil türlerinden mercimek ve bezelye ile birlikte kültüre alındığı anlaşılmaktadır. Nohutun kültürü batıda Filistin-Yunanistan ile Akdeniz bölgesine ve Doğuda Hindistan’a kadar yayılmıştır. Kuzey Afrika’nın batı kısımlarında yalnız büyük taneli nohut formları tanınmaktadır. Bu çeşitler, Yunanlılar ve Romalılar tarafından tüm Akdeniz yöresine taşınmıştır (Singh, 1998).

2.1.3. COĞRAFİ DAĞILIŞI

Nohut tarımı dünya üzerinde batıda Etiyopya, Yunanistan, Girit; küçük Asya’da Türkiye, İran, Irak, Suriye, İsrail ve Kafkaslar; Doğu’da Orta Asya, Himalayalar ve Afganistan’a kadar yayılmıştır. Kültürü yapılmakta olan nohut çeşitleri bu bölgelerden dünyanın birçok bölgelerine taşınmıştır. Nohutun orijinal yetişme alanları, 22-85° doğu boylamları ile 30-52° kuzey enlemlerinin arasında kalan alanlardır.

2.1.4. TÜRKİYE DE NOHUT POPULASYONU

Nohut populasyonu, Türkiye’nin ekilen alanının yaklaşık %40’nı içermektedir. Nohutun %60’ı Orta Anadolu , Akdeniz, Güneydoğu Anadolu Bölgesi ile kuzey ve batı kesimlerini işgal etmektedir. Fakat 1970 yıllarının ortalarına kadar geleneksel tarım uygulamaları bu bölgelerde oldukça yaygındır. Çünkü bu alanlarda yetişen tahıllar toprağın nemini korumaya yardım etmektedir. Tahıllardan sonra ilk sırayı yemeklik dane baklagillerden nohut ve yeşil mercimek almakta özellikle Çankırı ve Çorum da yaygın olarak yetiştirilmektedir (Singh, 1990).

2.2. NOHUTUN FİLOGENİSİ, SİSTEMATİĞİ, SİTOLOJİSİ

Nohut, *Papillionaideae* alt familyasına ve *Leguminosae* (baklagiller) familyasına ait bir türdür. Bu cins 43 türden ibarettir. Bu türlerin 34'ü yabani çok yıllık form, 8'i yabani tek yıllık form ve tek yıllık kültür formu olan *C. arietinum* L. den ibarettir (Malhotra et.al., 1994). Nohut, dünyada tüketilen en önemli yemeklik dane baklagillerdendir. 8 yıllık türlerin genetik akrabalıkları ve gelişimi Monocicer bölümünde gruplandırılmıştır. *C. chorassanicum* tek yıllık türlerin en sonuncusudur. Bu tür *Chamaecicer* bölümü içerisinde sınıflandırılmıştır. Tek yıllık türler melezlemeye dayalı olarak 4 grup altında değerlendirilmektedir.

Nohut, karyotip, izozim polimorfizmi ve protein içeriği bakımından da önemlidir. İlk gruptaki türler kültür formlarını içermektedir. Çok yıllık *C. anatolicum* ise Policicer grubunda yer almaktadır. Fakat, izozim benzerlikleri açısından *C. anatolicum*, *C. echinospermum* ve *C. reticulatum* gibi yabani formlarla da filogenetik açıdan akrabalık dereceleri yüksektir (Muehlbauer and Singh, 1997). Diğer bir grup ise, *C. bijugum*, *C. pinnatifidum*, *C. judaicum* ve *C. yamashitae*'den ibarettir. Geride kalan iki tür ise, *C. cuneatum* ve *C. chorassanicum*'dur. Bunlar hem birbirleriyle hem de başka türlerle çaprazlanabilirler.

Nohut genomu yaklaşık olarak 740 Mb.'dir. Kültür nohutu olan *C. arietinum* karyotipi uzun ve satellit kromozoma sahip olmasıyla karakterize edilmektedir. Ayrıca bu tür 4 metasentrik ve 3 tane de diğerlerine göre kısa olan kromozoma sahiptir (Weeden et.al., 2000 and 1997). Nohut, Asya da ilk olarak yetiştirilmiştir yani o bölgeden orjin almaktadır. İlk olarak yetiştirilen yabani form ise *C. arietinum*'dur. *C. arietinum* ve *C. reticulatum* melezlemesi sonucu oluşan hibritlerin sitolojik çalışmaları bütün kromozom çiftlerinin mayoz bölünme geçirdiğini göstermektedir. Hibritler ve diğer döller tamamıyla fertildir.

Nohutun desi ve kabuli olmak üzere iki tipi tanımlanmıştır. Desi tip; küçük taneli olup çiçek, kök, yaprak ve tohum çeşitli pigmentler içermektedir. Desi tip, pürüzlü yüzeye sahip olup kuru alanlarda iyi yetişmesine rağmen iri taneli kabuli tip ise; Meksika, Kanada, Avustralya, Amerika ve Akdeniz bölgesi gibi verimli tarım alanlarında iyi yetişmektedir. Ayrıca kabuli tip, beyaz çiçekli ve düz yüzeyli olup genellikle krem renginde iri taneli halk arasında en çok tüketilen ve özellikle de Türkiye için en popüler türdür.

Nohut, kuraklığa karşı tolerans gösteren bir üründür. Ürün soğuga karşı da iyi adapte olmuştur (Şehirali, 1996). 4 ay ve daha uzun zaman da yetişmektedir. Ayrıca nohut baklagillerden olduğu için *Rhizobium* bakterileriyle ortak yaşayarak atmosferdeki azot fiksasyonunda önemli rol oynamaktadır. Nohut, ortalama olarak Türkiye de 800 hektarlık alanda yetiştirilmektedir (FAO, 1998). Türkiye de nohut üretimi dünya ortalamasının üzerindedir. Fakat buğday, arpa, bezelye ve mercimek gibi alternatif olarak tüketilen ürünlere nisbeten maliyeti yüksek bir üründür.

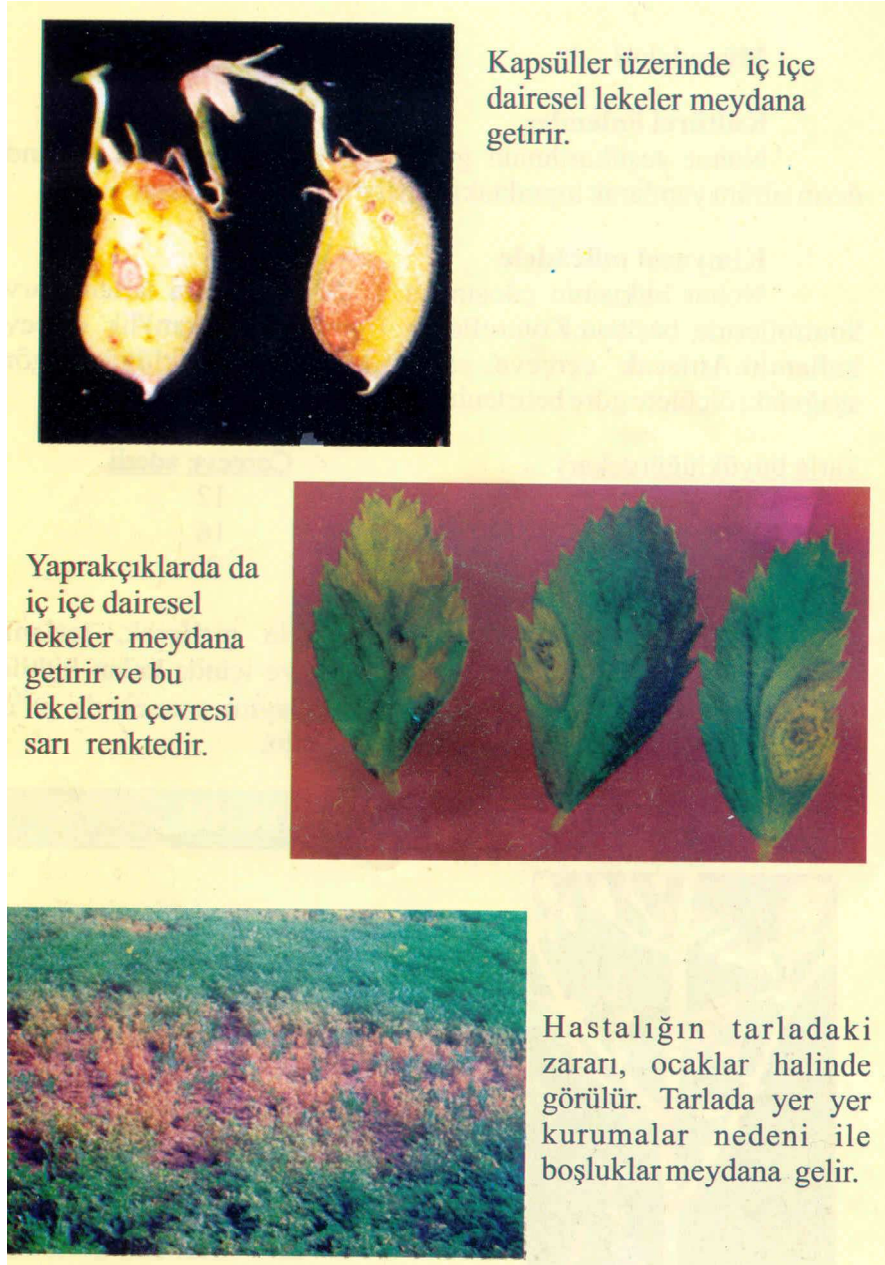
İslah üzerine olan ilk araştırmalar 1900 yıllarında Hindistan da başlamıştır. Fakat son yıllara kadar nohut genetiği üzerine az çalışmalar yapılmıştır (Tanksley et.al., 1989). Nohut ıslah çalışmaları 1991’de Van Rheenen tarafından gözden geçirilmiştir, aynı zamanda 200’den fazla çeşit üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bu çeşitler daha az genetik farklılıklar göstermektedirler. Türler özellikle belli çevrelere adapte olmuş ve birden çok hastalığa karşı hassasiyet gösteren formlardır. Ayrıca nohut genomunun genetik analizini yaparak genetik değişimini gözlemek mümkündür. RFLP, izozim ve RAPD gibi moleküler markır teknikleri ile *C. arietinum* gibi kültür formlarında minimal polimorfizm gözlenmiştir (Simon and Muehlbauer, 1997). *C. arietinum* ile *C. reticulatum*’un tür içi melezlemeleri yapılarak hibrit ırkların kullanılmasıyla bazı problemlerin üstesinden gelinmiştir. Bu melezler tamamıyla polimorfik olup fertildir.

Nohutun verimi *Ascochyta blight*, *Fusarium wilt*, *Botrytis grey mold*, *Heliocoverpa*, *pod borer*, kuraklık, soğuk ve tuzluluk gibi biyotik ve abiyotik stres faktörlerinin etkisi ile sınırlı olmaktadır (Michelmore et.al., 1991). Fakat moleküler markırlarla direnç genlerinin tayin edilmesi etkili bir ıslah sisteminin gelişmesine yardımcı olacaktır. Ekonomik olarak önemli olan özelliklerin genetik yapısının bilinmesi ıslah materyalinin geliştirilmesini ve dayanıklı tür eldesini mümkün kılmaktadır (Weeden et.al., 2001).

2.3. NOHUT PATOLOJİSİ

Hastalıklar, WANA bölgesinde nohut üretimini sınırlandıran çok önemli biyotik stres faktörleridir. Nohut patolojisi ile yani nohut hastalıklarıyla uğraşan patoloğlar ve ıslahçılar hastalıklara dirençli ıslah materyallerinin ürün veriminin artırılması için zenginleştirilmesinin gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Nohuda zarar veren yaklaşık 50 hastalık mevcuttur. Ama en etkili olan hatta ürünün tamamen yok olmasına neden olan tehlikeli biyotik stres ise *Ascochyta blight* denilen nohut antraknozudur (Şekil 2.1).

Ascochyta blight, *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. denilen mantarın neden olduğu ciddi bir hastalıktır. Nohudu direkt olarak etkileyen ve ürünün kök, gövde, yaprak ve kapsüllerinde kahverengi lezyonlar meydana getiren ürünün yok olmasını sağlayan ve özellikle kışın 15-25 °C gibi düşük sıcaklıklarda daha etkili olan bir hastalıktır. Ayrıca, toprak ve tohum kaynaklı patojenler, köklerin çürümesine ve kapsüllerdeki tohumun dökülmesine neden olmaktadır. Özellikle iri taneli kabuli tiplerde küçük taneli desi tiplerine oranla hastalık daha etkili olmaktadır. Çünkü iri taneli nohut lif yüzdesinin fazla olmasından dolayı mantar için uygun besin ortamını oluşturmaktadır. Tüm dünya da hem desi ve hem de kabuli tip olmak üzere Suriye de ICARDA tarafından yapılan araştırmalara göre 15000'in üzerinde nohut ırkı bulunmaktadır (Reddy and Singh, 1984). Çok sayıda kültür nohodu hatları vejetatif safhalarında birkaç enfeksiyona karşı direnç göstermektedir, fakat hatların enfeksiyonlara karşı direnci bölgeye göre değişmektedir.



Şekil 2.1 Nohut (*Cicer arietinum* L.) Antraknozu

Genellikle bu hatlar Hindistan, Pakistan, Batı Asya, Kuzey Afrika (WANA) ve Avrupa'nın güneyindeki şehirlere göre hastalığa daha fazla maruz kalmaktadır. Hatların farklı reaksiyon göstermesi blight patojenindeki fizyolojik özelliklere de bağlıdır (Singh and Reddy, 1983). ILC72, ILC182, ILC201, ILC202, ILC2380, ILC2956, ILC3279, ILC3868, ILC3870 ve ILC4421 bölgelere göre direnç mekanizması geliştirmişlerdir (Singh and Reddy, 1989). Bunların çoğu hem kabulü hem de ara formlarda bulunmaktadır. Onlar uzun ve geç olgunlaşma dönemine sahiptirler. Birkaç ıslah hattı; FLIP82-191C, FLIP83-46C, FLIP83-49C, FLIP83-72C, FLIP83-97C, FLIP84-83C, FLIP84-93C son zamanlarda direnç gösterdiği ısbatlanarak ICARDA tarafından üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (Burow and Blake, 1998).

2.4. NOHUTTA HASTALIĞA DİRENÇ GELİŞMESİ

Ascochyta blight için nohuttaki genetik direnç hastalığın kontrolü açısından son derece önemlidir. Fakat hastalığa karşı dirençli olan hatlar çok azdır. Sadece desi ve kabulü formlarının %29 ile %0.06'sı direnç göstermektedir. Bir inanışa göre, hem direnç seviyesi hem de direnç oluşum mekanizması, kabulü tiplerde desi tiplerden daha yüksektir. ILC194, ILC2548, ILC2160, ICC5127 gibi kabulü ve desi tipleri vejetatif safhalarında dirençlidir ama daha sonra kapsüllerde enfeksiyon gelişmektedir. ILC195 gibi birkaç hat, kapsül oluşum evresinde hastalıklara karşı vejetatif evreden daha hassasiyet göstermektedirler. Her iki safhada da hastalığa dirençli olan hatların kullanımı genetik ıslah için gereklidir (Malhotra, 2000).

Direnç gösteren kabulü formlar diğerlerine nisbeten daha küçük taneli olup, geç olgunlaşmaktadırlar. Bunlar ulusal nohut ıslah programlarında ICARDA ve ICRISAT tarafından dirençli kaynaklar olarak belirtilip Hindistan, Pakistan, Suriye ve Türkiye de yetiştirilmektedir (Açıkgöz, 1997). Hastalık etkeni olan mantarda kendiliğinden direnç gelişebilir bu nedenle ya konakçı bitkide veya parazitte oluşan direnç çoklu direncin gelişmesini sağlamaktadır. Mantarda bulunan hastalık geni ile bitkide bulunan hastalığa karşı direnç mekanizmasını taşıyan direnç geni arasındaki "gen için gen" ilişkisinin gelişmesiyle etkili olmuş ve dirençli nohut genotiplerinin

gelişmesine hız kazandırmıştır (Heath, 1987). Gen için gen ilişkisi, patojene karşı konakçı bitkinin direncini veya hassasiyetini ifade etmektedir (Kaiser and Crute, 1994) Ayrıca bu ilişki patojenik genotiplerin hastalık oluşturma etkilerinin farklı olduğunu göstermektedir (Dey and Singh, 1993).

2.5. NOHUTUN GENETİK GELİŞİMİ

Uygun ıslah programlarının izlenebilmesi için nohut hakkında genetik bilginin gelişmesine ihtiyaç vardır. Son zamanlarda nohut için, morfolojik, izoenzim ve DNA markırları denilen uygun bağlantı grupları meydana gelmiştir. Direnç genini etiketlemek ve önemli olan genlerin yerlerini belirlemek için nohut genom haritası geliştirilmiştir. Baklagillerde görülen hastalıklara karşı genetik mühendisliği sayesinde uygulanan biyoteknolojik çalışmalar tam bir prosedür içermemesine rağmen gelecek için önemli olan kronik problemlerin çözümlenmesine olanak tanımaktadır. Soğuk hava şartlarına toleransın sağlanması ve kışın ekimin yapılması gibi geleneksel metodlar artık ürün artışı için sınırlı kalmaktadır. Tüm ürünler de çevresel stres faktörleri önemli rol oynamaktadır, fakat biyoteknolojik metodlarla bunların üstesinden gelinebilmektedir (Porta-Puglia et.al., 1998).

Bitki genetikçilerinin çalışmalarında, ürün için gerekli olan yüksek yoğunluğa sahip gen haritalarının oluşturulmasında moleküler markırlar kullanılmaktadır (Faris et.al.,1999). İlgili moleküler markırlar, o özelliğe özgü olan genin etiketlenmesi, hastalığa karşı direnç gösteren hastalık geni gibi kantitatif karakterlerin bulunduğu bölgelerin (QTL) tanımlanması ve uygun özelliklerin yabani formlardan kültür formlarına transfer edilmesinde faydalı olmaktadır (Foolad et. al.,1995).

Nohutta gözlenen kantitatif özelliklerin çoğu kalıtsaldır. İyi tanımlanmış genom için veya genom haritasının oluşturulması için ilgili genin bulunduğu bölgenin belirlenmesi gerekmektedir. Ürün ıslah programlarında, genetik mühendisliği ve klonlama teknolojisi gibi daha genel kullanım alanları mevcuttur.

Hastalıklara karşı direncin geliştirilmesi için QTL'nin biyolojik açıdan önemi genellikle sınırlıdır.

Son yıllarda bitki-mikrop ilişkileri; genom haritalama, kantitatif hastalık direnci ve bitki savunmasını içeren genleri belirlememize ve anlamamıza öncülük etmektedir. Nohuttaki kantitatif genetik mekanizma, nohut genetiğine bağlıdır. Bunlar; yaprak yüzeyi, yaprakların dağılımı, bitkinin yaşadığı yer, çiçek rengi, tohum şekli, kotiledon rengi, çiçek ve kapsüllerin durumu ve en önemlisi hastalıklara karşı direnç oluşumu gibi özellikler kantitatif özelliklerdir. Bunların çoğu kalıtsal olmakla birlikte türler arasında o karaktere özgü genlerin transferi mümkün olmaktadır (Ford et.al., 1996).

2.6. DİRENÇ MEKANİZMASI

Bitkiler, nematodlar ve böcekler gibi mikrobiyal ajanlarla sürekli mücadele etmektedirler. Bitkiler, bünyelerinde bulunan direnç genleri sayesinde (R gen) mikrobiyal ajanlara karşı savunma mekanizması geliştirmişlerdir. Fakat patojende bulunan avirülans yani hastalık yapma etkisi fazla olan virülans genleri (Avr) vardır. Bu genler patojenin protein yapısından kaynaklanmaktadır. Virulans genleri patojende hastalandırıcı gücü olan proteinin sentezini sağlamaktadır. Bitkinin direnç mekanizmasını geliştirmesi direnç geni sayesinde olmaktadır. R geni vasıtasıyla direnç oluşumu yaygındır. Bitki hücrelerinde nekroz gelişmesine neden olan patojenler bitkiyi savunmasız hale getirir ve hastalandırılırlar. Bitki ile patojenin uyumu çok önemlidir. Bazı bitkilerde simbiyoz yaşayan azot bakterileri gibi patojenler bitki için fayda sağlamaktadırlar oysaki, *Ascochyta rabiei* denilen mantarın oluşturduğu nohut antraknozu ciddi bir hastalıktır (Ford et.al., 1999).

Bitkiler üzerinde yapılan son genetik çalışmalarla mutant karakterli yeni bitkiler oluşur böylece bitkide hastalığa karşı direnç geliştirilmiş olur (Feys, 2000). Mikrodalga teknolojisi, hastalığa karşı direncin oluşmasında ve genetik analizlerin yapılmasında önemli rol oynamaktadır. Bitkiler, patojenik organizmalara karşı direnç mekanizması geliştirmek için farklı mekanizmalar kullanmaktadırlar.

Etkili direnç mekanizması, çok farklı gen tarafından özelleştirilmiş birden çok karakteri içermektedir (Pryor, 1987).

Direnç, bitki hastalıklarını kontrol etmek için ideal yoldur. Bitki hastalıklarına karşı direnç; genetik direnç, fizyolojik direnç, anatomik veya mekaniksel direnç ile dayanıklılık mekanizmalarını içeren biyolojik olayları kapsamaktadır. Bitkiler, hastalıklara karşı farklı derecede hassasiyet göstermektedirler. Bu nedenle çiftçiler, hastalıklara karşı daha toleranslı olan ürünleri seçerek bunların ekimini yapmaktadırlar. Böylece türler daha sonraki döllerde varyasyon veya mutasyonla dirençli hale gelebilirler. Seçimle dirençli türlerin geliştirilmesi günümüzde de aynı şekilde uygulanmaktadır. Hastalığa dirençli bitkilerin üretilmesi için en etkili yol hibridizasyondur. Yani hibrit türlerin elde edilmesidir. Bunun için 1900'lerde geliştirilmiş olan Mendel kanunları etkili olmaktadır. Hastalığa dirençli ırkların ıslah edilmesinde yine bu kanunlar gözönünde tutulmaktadır.

Klasik bitki ıslahı, hastalığa karşı dirençli olan ürünlerin geliştirilip ıslah edilmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntemle sürekli direnç geliştirilen çok sayıda örnek vardır. Fakat sürekli direnç oluşumu için tek genetik model veya direncin tanımlanmasını sağlayan tipik bir fenotip bulunmamaktadır (Johnson, 2000).

Baklagillerden olan nohut (*C. arietinum L.*), güvercin bezelyesi (*Cajanus cajan L.*), börülce (*Vigna unguiculata L.*), bakla (*Vicia faba L.*), mercimek (*Lens culinaris L.*) gibi ürünlerde çok sayıda hastalığa karşı direnç geliştirilmiştir. Fakat bunlar mantar, nematod, virüs ve bakteri gibi biyotik stres faktörleri yüzünden sürekli olarak hastalıklara maruz kalmaktadırlar. Hatta bitkide renk solgunluğu, kök çürümesi, küllenme, pas oluşumu, yaprakların çürümesi, kök düğümlenmesi ve kist nematodları gibi hastalıklar meydana getirmektedirler (Nevo, 1998).

Bitkilerde patojenlere karşı tabii korunma, bitki de varolan savunma mekanizmasına bağlıdır. Bu kombine etki mekanizması, sürekli olarak kendiliğinden gelişen direnç olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca, bitkiler bu patojenlerle ilişkili olan koruyucu mekanizmaları aktive etmektedirler (Sticher et. al., 1997).

Gen için gen direncini tanımlayan bitki, herhangi bir patojene karşı hem hassasiyet hem de direnç gösterebilmektedir. Oysa, kazanılmış direnç, mikroorganizmalara karşı kantitatif koruyucu etki göstermektedir. Bitkilerde hastalık direnci tek ve genellikle de dominant olan genlerle tanımlanmıştır. Bu nedenle direnç genlerinin klonlanması gerekmektedir. Bitkilerde savunma sistemi, ya kalıtsaldır ya da bağışıklık sisteminin gelişimine bağlıdır. Bitkilerdeki direnç (R) genlerine benzer genlere memelilerde de rastlanmaktadır (Michelmore and Meyers, 1998). Tüm dünyadaki nohut üretimini sınırlandıran en önemli hastalık *Ascochyta blight*'tır. Hastalığı yok etmek için çok gayret gösterilmişse de başarılı olunamamıştır (Singh and Reddy, 1990 and 1993). Hastalık nohut üreten ülkelerde daima ciddi kayıplara neden olmaktadır. Nohutun 8 yıllık yabancı formları *Ascochyta blight*'a karşı hassastır. Yabancı ırklara benzer değişim kültür formlarında da gözlenmektedir (Singh and Kaur, 1988). Yabancı nohut formları sadece direnç genleri için faydalı olmaktadır. Fakat şu anda yabancı formlarla melezlenmiş kültür formlarında aynı kromozoma sahip olmalarına rağmen direnç gelişmemiştir. Bitkilerde hastalık kantitatif bir özellik olduğu için karakteri kontrol eden genlerin karakterize edilip tanımlanması oldukça zordur. Bitki patoloğları, ıslahçılar, genetikçiler ve moleküler biyologlar çoklu direnç gösteren fenotiplerin elde edilmesi için araştırmalar yapmışlardır. Genlerin analiz edilmesi kantitatif karakterlerin bulunduğu (QTL) bölgenin haritalanmasından önce hastalığa karşı kompleks direncin nasıl meydana geldiğinin anlaşılması gerekmektedir.

DNA markırları ve QTL haritalama ile, hastalığa karşı direnç oluşumu ve onları yöneten genlerin bulunması çok kolay olmaktadır. Günümüzde kantitatif ve kalitatif karakterlere karşı geliştirilen direnç mekanizmasının farkını ayırmak oldukça güçtür. Çünkü her iki özelliği de taşıyan gen aynı lokusta bulunabilmektedir (Young, 1996).

2.6.1. MARKIR YARDIMLI SEÇİM VE BİTKİ HASTALIK DİRENCİ

Direnci tanımlayan genler, tekrarlı geri melezleme teknikleri ile geleneksel olarak seçilebilmektedir. Fakat genle yakın ilişkili olan markırlar da markır yardımıyla seçim amacıyla kullanılabilir. Bu yöntem, gelişmekte olan ve ticari olarak kullanılan ürünlerde jenerasyonların sayısını ve populasyon hacmini artırmaktadır.

Bu amaçla bulk segregasyon tekniği kullanılmaktadır (Zhao et. al., 1996). ILL5588 nohut genotipinde *Ascochyta blight*'a direnci tanımlayan dirençli bölge ile yakın ilişkili 7 RAPD markır tanımlanmıştır. Bu markırların uzunluğu 5<30 cM arasında olup MAS'de kullanılmaktadır (Yee et. al., 1999).

İslah programlarında istenilen özelliklere sahip ürünün seçilebilmesi genotipik durumuna dayalı olarak QTL haritalama ve DNA markırlarının kullanılmasıyla mümkün olmaktadır. Genom haritasında bulunan genomik bölgedeki DNA markırları bitkinin fenotipik karakterinden çok (morfolojik özellikleri) genotipik yapısı hakkında bilgi vermektedir. Moleküler markırlar sayesinde tarla denemelerine gerek kalmaksızın laboratuvar ortamında ve daha kısa sürede kesin olan sonuçları elde etmek mümkündür. Kromozomlar üzerinde karakterlere özgü olarak bulunan genler, markırlar sayesinde geri melezlemeye gerek kalmaksızın istenilen bireyin seçilmesinde kullanılabilirler. Böylece markır yardımıyla seçimle kültür formları tamamen değiştirilebilmektedir.

2.6.2. DİRENÇ İÇİN ISLAH

Dirençli türlerin ıslah edilmesi için kullanılan metodlar moleküler tekniklere dayanmaktadır. Bulk segregasyon analizi ve Pedigree selection yöntemleri ICARDA tarafından hem nohutta hem de mercimek ıslahında başarılı olarak kullanılmaktadır. İslah çalışmalarında kontrol amacıyla kullanılan yabancı formlar *Ascochyta blight*'a direnç genlerini taşımaktadır. Yabancı nohut genotiplerinde gen havuzunda çok sayıda gen bulunmaktadır. Bu nedenle yabancı genotiplerden kültür formlarına direnç genlerinin transfer edilmesi, dirençli genotipin ıslah edilmesi için önemli bir metoddur. Kültür ve yabancı formların hibritleri (melez ırkları) arasında da geleneksel ıslah metodlarının uygulanmasından başka geri melezleme gibi biyoteknolojik yöntemlerle dirençli olan genin transferi yapılmaktadır. Bu teknik direnç genlerini de içeren diğer genlerin ve bu genlerin kodladığı özelliklerin, yani faydalı genlerin yabancı formlardan kültür formlarına aktarılmasında kullanılan önemli bir metoddur (Young et al., 1996).

2.7. MOLEKÜLER MARKIR (GENETİK MARKIR)

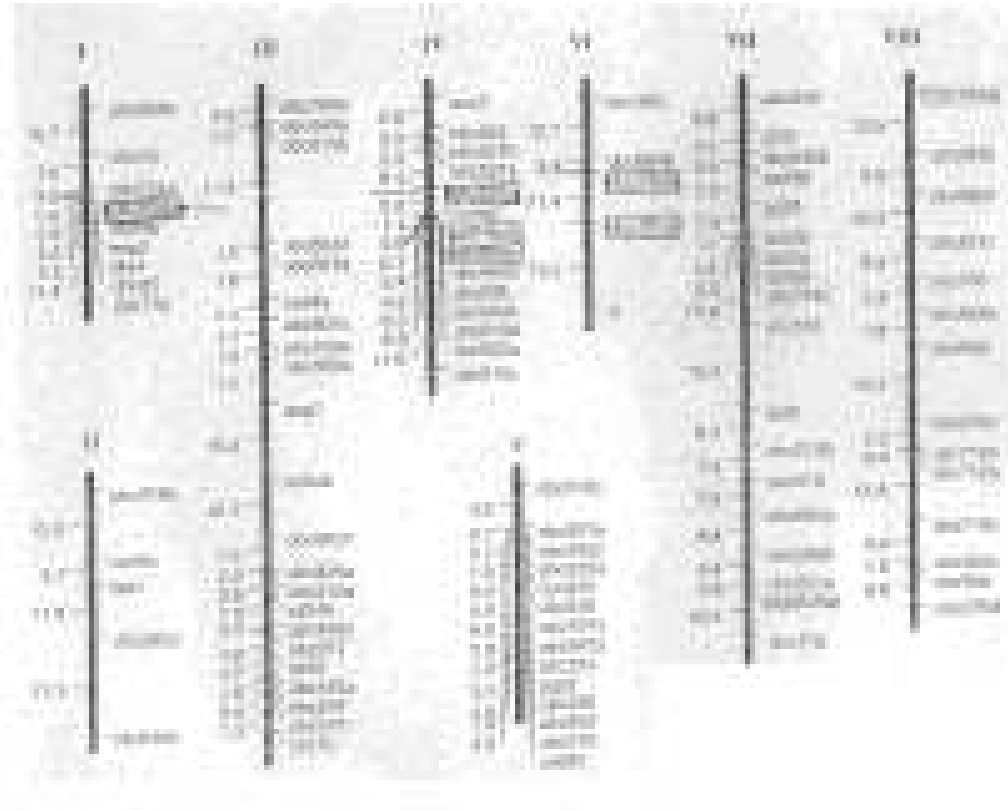
Bitki ıslahı, hem ilim dalı ve hem bilimsel çalışmaları gerektiren bir alandır. Yani hem kantitatif hem de kalitatif özellikleri kapsayan biyoteknolojik özelliklerin tümüdür. Bitkideki fenotipik değişiklikler morfolojik olarak görülebilen kalitatif özelliklerdir. Fakat genotipik özellikler yani genlerde meydana gelen değişikliklerle kendini gösteren özellikler ise kantitatifdir. Fenotipik değişiklikler çevreden kaynaklanan varyasyonlardır. Tarihsel olarak kantitatif genetikte ilk sorulardan biri hem sürekli tekrar eden özelliklerin kalıtsal olması hem de Mendel kurallarının etkili şekilde uygulanmasıdır. Bitki ıslahı için, en önemli faktör ise moleküler markırların etkili bir biçimde kullanılmasıdır.

1980'li yıllarda bitki ve hayvan genetiği ile uğraşan bilim adamları, kromozomlarda lokalize olmuş genlerle ilgili olarak çoklu faktör hipotezini savunan genel bir modelin şekillenmesinde önemli katkıları olmuştur. Bu nedenle bazan direkt olarak ilgili veya çevrenin etkisiyle meydana gelen ve kalıtsal olmayan fenotipik değişiklikler sözkonusudur. Kantitatif karakterlerin kalıtsal olması konusunda çok araştırmalar yapılmasına rağmen, bitki ıslahçıları daha az bilgiye sahiptirler. Bu genlerin kromozomlardaki yeri, özelliğin ifade edilmesi için son derece önemlidir. Markır yardımlı seleksiyonda, markıra dayanan prosedür kantitatif karakterlerin ıslah edilmesinde ve uygulanmasında etkili olmaktadır.

Markıra dayanan teknikler, bilim adamlarının daha iyi anlaşılmasına yardım etmektedir. Böylece ıslahçılar ve genetikçiler genom haritasının oluşturulması ve bu özelliklerin ifade edilmesi için yapılan tüm uygulamaları içine almaktadır. Haritalanmış genetik markırların etkili biçimde kullanılması bitki ıslahında ve seçim stratejilerinde önemli gelişmelere izin vermektedir. Morfolojik özelliklerin de ifade edilmesini sağlayan markırlardır. Fakat bu markırların bu amaç için kullanım alanları sınırlıdır (Tanksley and McCouch, 1997). Birbirleriyle yakın ilişkide olan akraba türler ve genotipler arasındaki benzerliklerin tayini ve analizi içinde moleküler markırlar kullanılmaktadır. Ayrıca, bu markırların tarımsal verimi artırmak için çok önemli katkıları bulunmaktadır.

Son yıllarda moleküler biyoloji alanında tarımsal türleri de içeren yüksek yapılı organizmaların detaylı olarak genetik analizlerinin incelenmesi de moleküler markırlarla yapılmaktadır. DNA markırları, çok sayıda organizmada genetik hastalıklardan sorumlu olan genleri tanımlayan metodlarda da kullanılmaktadır.

Genetik haritanın yapılması ve kullanılmasında DNA markırları önemlidir. Çünkü DNA markırları ile tam bir genetik harita oluşturulabilmektedir. Bu harita, bir organizmadaki tüm kromozomları ve kromozomların bulunduğu bölgeler hakkında bilgi vermektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Nohut Genom Haritası (Santra et.al., 1999)

Tarımda, DNA markırları tohumdan domates yetiştirme, domates tohumu ve çam fidanının geleceğe katkılarını tahmin etmek için de kullanılmaktadır. Ayrıca, DNA markırları aynı konulara yeni boyutlar getirmiştir. Klasik teknikleri uygulamanın güç olduğunu kanıtlayan bazı konulara yeni yaklaşımlar sağlayabilir. Örneğin, böylece evcil kültür ırkları içerisinde yabani germplazmlardan değişik özelliklerin seçilerek transfer edilmesi sağlanabilmektedir (Paterson et. al., 1991).

Genomik çalışmalarda, moleküler markırlarla analiz yapmak, ıslah edilmiş yeni ürünlerin geliştirilmesinde etkilidir. Bu metodun en önemli avantajı kantitatif ve kalitatif karakterlerin tanımlanması için DNA izole etmektir (Kaufman et. al., 1999). Genetik harita yapmak, bir organizmanın genetik yapısı ve bilgisi için avantaj sağlamaktadır. Çünkü kromozom denilen yapılar diğer ırklara (döllere) geçebilmektedir. Genetik markırlar, bireyde veya genotipte bulunan kromozom segmentinin kaynağı olan ebeveyni tanımlamak içinde faydalıdır (Paterson et. al., 1991).

Yapay seleksiyonla bir türün genetik ıslahı; genetik etkilerden faydalanma yeteneğine bağlıdır. Genetik etkiler çevresel etkilerden farklıdır. Fenotipik seleksiyon allelik etkilere dayanmaktadır. Bunlar, ıslah popülasyonlarında ekonomik olarak önemli değişiklikler sağlayabilmektedir. Genetik markırlar, seçim tekniği olarak bitki ıslahçıları tarafından kullanılmaktadırlar. Markır yardımcı seçim etkinliğini ve kalitesini artırmada bir potansiyel sağlamaktadır. Fenotipik değişimin belirleyicisi olarak markırların kullanılması ve genlerin markırlarla etiketlenmesi çok faktöre bağlıdır. MAS’de kullanılan genetik markırların tahmini değeri onların kalıtsal olmasına, tekrarlı diziler oluşturma yeteneğine ve genomik haritanın durumuna bağlıdır (Wu and Han,2000). Genetik değişikliği ölçmek için çok çeşitli moleküler teknikler geliştirilmiştir (Yee, 1999).

DNA markırları bitki genetiğinde zorunlu bir teknik olarak kullanılmaktadır. Markır yardımıyla seçim ve gen haritalamada önemli bir değere sahiptir. Kalıtsal özelliklerin haritalanması ve istenilen karakterlere özgü genlerin biraraya getirilerek gen piramitlerinin oluşturulmasında etkili olarak kullanılmaktadır

(Michelmore et.al.,1991). DNA havuzu kullanılarak karakterlerin haritalanmasında RFLP veya diğer markırlar sorumludur. Fakat bu çalışmalar, RAPD markırların kullanılmasıyla daha elverişli hale getirilmiştir (Williams et. al.,1990). Haritalama da yani genotipin genom haritasının çıkarılmasında RFLP (Restriksiyon Fragment Lenght Polymorphism) tekniği başarılı olarak kullanılmıştır. Haritalamada kantitatif karakterler veya bireyin genetik faktörleri dikkate alınmaktadır (Wang and Paterson,1994).

2.7.1. MARKIR TİPLERİ

2.7.1.1. Morfolojik Markırlar

Morfolojik karakterler tek bir lokusun kontrolü altında olup genetik markırlar olarak kullanılmaktadır. Kodominant morfolojik markırlar seçimde genetik durumun habercisi olarak faydalıdır. Örneğin, salatalık (*Cucumis sativus L.*) belirli karakterlerin ifade edilmesinde çevresel etkilerin değişmesiyle farklılıklar gösterebilirler, çünkü bir genin tanımlanmasında çevre şartları da fenotipik yapıdaki farklılıklar kadar etkili olmaktadır (Garvin and Weeden, 1994).

2.7.1.2. İzoenzim

İzoenzimler, elektroforetik yöntemler kullanılarak ayrılmış olan protein moleküllerinin jelde (nişastalı jel) farklı olarak koşması yani yürütülmesi esasına dayanmaktadır. Çünkü enzimler özel biyokimyasal reaksiyonları katalize ettiklerinden uygun substrat ve kofaktörle jelde özel bir enzimin lokasyonunu göstermeyi sağlarlar. Renk oluşumunu gösteren bir reaksiyonda enzimatik reaksiyon ürünü jelde birikinti yapar ve gözle görülebilen bantlar meydana getirir, özel enzimden oluşan bantlar protein ürünlerini belirtir ve izoenzimler genetik bir temele sahip olan ve kodominant markırlar olarak genetik bilgiyi tanımlayan markırlardır (Kazan et.al., 1993).

2.7.1.3. Restriksiyon Fragment Lenght Polymorphism (RFLP)

RFLP, restriksiyon enzimlerinin kullanılmasıyla gerçekleştirilen ve PCR'a dayalı bir moleküler biyoloji tekniğidir. Restriksiyon enzimleri, özel nükleotid dizilerinde genomik DNA molekülünün kesilmesini sağlar. Genomik DNA fragmentlerinin tanımlanması Southern blotting tekniği kullanılarak yapılmaktadır.

Bu teknikte, elektroforezle ayrılmış olan DNA fragmentleri jelden alınarak nitrosellüloz veya naylon filtreye aktarılır (Southern, 1979). Radyoaktif olarak işaretlenmiş DNA probu radyoaktif olmayan nükleotid analogu filtre üzerinde tutulan fragmentler ile uygun şartlar sağlanarak hibridize edilir. Daha sonra filtre üzerine bir röntgen filmi konularak otoradyografi işlemi gerçekleştirilir. Prob, yalnızca kendisini tamamlayıcı bazlar içeren DNA fragmenti ile hibridize olacak ve otoradyogram sonucu bu bandın varlığı gözlenebilecektir. PCR reaksiyonu, DNA markır sistemlerinin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. PCR'a dayalı markır sistemlerinin geliştirilmesinde 3 strateji uygulanmaktadır (Banerjee et.al., 1999).

- PCR'da, tek bir primer kullanılarak çoğaltılan markırlar vardır. Bu markırlarda primerin uzunluğundaki değişikliklerden bile farklı sonuçlar elde edilmektedir (RAPD, SPAR, DAF, AP-PCR, SSR).
- PCR'da, iki primer kullanılarak çoğaltılmış markırlar vardır. Bu markırlar iki primerle çoğaltılır fakat özel primerlerin dizilimi ve klonlanması farklı olmaktadır.
- PCR'da ikiden çok primerle çoğaltılmış markırlar da vardır.

2.7.1.4. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

RAPD tekniği, genom haritalama ve genoma bağlı olan markırların analizi için yaygın olarak kullanılmaktadır. RAPD markırlar 10 nükleotid dizisinden meydana gelen dominant markırlardır (Williams et. al.,1990). Bu markır tiplerinin analizi bant vardır veya yoktur şeklinde olmaktadır. Ayrıca bu teknik diğerlerine göre daha hızlı olup daha az miktarda DNA gerektirdiği için çok tercih edilmektedir (Michelmore et. al., 1991).

RAPD markırlar, kültür nohutları ile yabani nohutları birbirinden ayırmak için de kullanılmaktadır. Çünkü, meydana gelen polimorfizm veya DNA parmakizi'ndeki farklılıklar genomik DNA'nın farklı bant oluşturmalarına neden olmaktadır. Ayrıca bu markırlar, genotipler arasındaki filogenetik ilişkinin tayin edilmesinde de kullanılmaktadır. RAPD tekniği, RFLP'den daha kolay bir metodur (Johns et.al., 1997).

Son zamanlarda bilim adamları germplazmaları veya genotipleri tayin etmek için bir metod olarak RAPD markırları kullanmaya başlamışlardır. Günümüzde bu teknoloji, Mendel'in kalıtım teorisine de dayanarak genetik olarak ilişkili bağlantı haritalarının oluşturulmasında bütün ürünlerde kullanılmıştır. RAPD tekniği veya onun modifikasyonları genetik haritalama, gen etiketleme ve tür çeşitliliğinin tanımlanması için çok faydalıdır (Weeden et. al., 2001).

RAPD, fasulye populasyonundaki genetik değişimi araştırmak için de kullanılmaktadır (Lee, 1995). RAPD tekniği, DNA problemleri veya primer dizisinin bilinmesine gerek olmadan basit olarak gerçekleştirilen tekniktir (Yee et. al., 1999). Hastalık direnci ve kantitatif karakterlerin farklı türler üzerinde markır yardımıyla seçim vasıtasıyla tanımlanmasının faydalı olduğu kanıtlanmıştır. İzoenzim, RFLP ve RAPD gibi moleküler markırlar gen haritalama da yaygın olarak kullanılmaktadır (Torres et. al, 1993).

Bizim çalışmamızda, *C. arietinum* ve *C. reticulatum* üzerinde 5 RAPD ve 5 STMS markırının nohut antraknozuna karşı dirençliliğe özgü olup olmadığının test edilmesi ve böylece nohut için tam ve kapsamlı bir genom haritasının geliştirilmesine yönelik ilk adımın atılarak dirençli genin izolasyonunun sağlanması ve transgenik türlerin elde edilmesi amaçlanmaktadır. Mesela, *Wilt* hastalığının direnç geni ile yakın ilişkili olan moleküler markırlar, germplazmanın gelişmesini, ıslah materyallerinin ve yeni kültürlerin geliştirilmesini oldukça kolaylaştırmaktadır (Mayer et. al., 1997; Simon and Muehlbauer, 1997).

Moleküler genetik haritalar, genotiplerin eşey hücrelerinin çaprazlanması ve RFLP segregasyon analizi ile oluşturulmuştur. Yeni bir DNA polimorfizm uygulaması nükleotid dizisinin tek bir primerle tesadüfi olarak DNA segmentlerinin çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Bu polimorfizm, bir ebeveyninden çoğaltılan DNA segmentleri olarak belirtilmiştir. Birbirleriyle yakın ilişkili DNA markırlarından ibaret olan genetik haritalar genom analizi için faydalı olmaktadır. DNA markırları, genetik olarak ilgili karakterlerle ilişkili genleri belirlemek ,gen klonlanlama, tıbbi teşhis ve tanı, bitki ve hayvan ıslah programlarında belirli karakterlerin seçilmesi için kullanılmaktadır. Bu primerler özel nükleotid dizisinin yokluğunda polimorfizm meydana getirmektedirler (Williams et. al., 1990).

RAPD markırlar, dominant oldukları için kendi-kendisiyle melezlenmiş olan homozigot ebeveynlerde kullanılan genetik haritalama için uygundur. Ayrıca RAPD markırlar homozigot bireylerden heterozigotları ayırmak için de kullanılmaktadırlar.

RAPD markırlar, bitki ıslah çalışmalarında ve DNA parmakizi'nin gözlenmesinde, populasyon genetiği çalışmalarında, genetik haritaların çıkarılmasında çok yaygın olarak tercih edilmektedir. Polimorfizmin gözlenmesi için en etkili yöntem olmasının yanında kromozoma özgü DNA fragmentlerinin izolasyonu ve tayininde çok kullanılmaktadır. RAPD markırlar, evrensel bir primer seti kullanarak farklı fenotiplerin genomik analizinin yapılmasında önemlidir. Bunlarla yapılan çalışmalarda klonlanmış DNA problemlerinin izolasyonu, hibridizasyon için filtre hazırlanması veya nükleotid dizisinin hazırlanmasına gerek yoktur (Karp et. al.,1997). İlgili karakterle ilişkili olan moleküler markırların *Ascochyta blight*'a direnç geni ile ilgili olan markırlar gibi tanımlanması sağlanmaktadır. Monogenic (tek bir gene bağlı özelliklerin haritalanması) karakterlerin haritalanması güvenli olduğu kadar da basittir. Agronomik önemi olan karakterler haritalanır ve bitki ıslahçıları tarafından ıslah programlarında bu bilgi kullanılır.

Ilıman bölgelerde ekimi yapılan baklagillerin genetik araştırmalarda yaygın olarak kullanılması, genlerin etiketlenmesi kompleks genetik temele dayanmaktadır. Bezelye de hastalığa direnç genlerinin çoğu DNA markırları ile etiketlenmiştir (Qiang et. al.,2000).

2.7.1.5. SCAR

Genellikle dominant markırlardır ve bazan teorik olarak 4 bç olan restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek kodominant markırlara dönüştürülebilmektedirler. Jel elektroforez tekniği ile polimorfizm tanımlaması yöntemi uygulanmaktadır.

2.7.1.6. ASAP

DNA'nın alkali ekstraksiyonunu içerir. Bu da allele özgü tek bir DNA fragmentinin ortaya çıkarılmasında etkili olan primerin kullanılmasıyla olmaktadır.

2.7.1.7. SPAR

Tek primer çoğaltma reaksiyonudur.

2.7.1.8. AFLP

Özel restriksiyon enzimleriyle kesilmiş olan DNA fragmentlerinin çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Bu yöntem daha çok kantitatif karakterler için kullanılmaktadır. Heterozigot ve homozigot genotiplerin çoğaltılmış bantlarla tanımlanmasını sağlamaktadır.

2.7.1.9. Mikrosatellit (STMS)

Mikrosatellitler nisbeten verimlidir ve bitkilerde yüksek polimorfik etkiye sahiptirler. Bunlar kodominant markırlardır (Akkaya et.al., 1995). Mikrosatellit moleküler markır teknikleri, yabani nohut türleri arasındaki genetik farklılığı belirlemek ve direnç genini etiketlemek için kullanılmaktadırlar (Choumane et.al., 2000). Mikrosatellitler 1 veya 5 baz içeren çok kısa tekrarlı baz dizileri olarak karakterize edilmektedirler. Tüm ökaryotik canlıların genomlarında dağılmış olarak bulunan kısa dalga boyuna sahip markırlardır. Bu markırlar, basit dizi tekrarları (SSR) veya basit tekrarlı DNA dizileri ya da ardışık olarak dizilmiş DNA tekrarları (STR) olarak adlandırılmaktadır. Mikrosatellitler son zamanlarda parmak izinin çıkarılması ve genetik haritanın oluşturulmasında çok kullanılmaktadırlar. Mikrosatellitlerin genetik haritalamada DNA markırları olarak kullanılabilmesi için lokus spesifik mikrosatellit markırlar izole edilmiştir.

Mikrosatellit markırlar lokus spesifik oldukları için, multiallelik ve yoğun bilgi içeriğine sahip olmalarından dolayı sınırlı dizi değişimi gösterdiklerinden tüm organizmalar için faydalıdır. Mikrosatellitler, CA / GT tekrarları ile hayvanlarda da çok önemli yerleri vardır. AT / TA tekrarları GA / CT tekrarları ile birbirini takip eden 3 veya 4 tekrarlı diziden ibarettir.

Bitkilerde yeralan mikrosatellitlerin çoğu diğer markır sistemlerinden çok daha yüksek derecede polimorfizm gösterirler. Ayrıca bu markırlar, genetik haritalama için mükemmel moleküler markırlar olup populasyon genetiği çalışmaları, çeşitliliğin tanımlanması, korunma, tohum yapısının ve hibrit kalitesinin gözlenmesi,

önemli genlerin etiketlenmesi, germplazm gelişimi ve filogenetik çalışmalar içinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Mikrosatellit markırların analizinde, ürünler PCR'la çoğaltıldıkları için çok az miktarlarda DNA gerekmektedir. Bu yöntemde her bir basamakta ayrı bir reaksiyon gerçekleşmektedir. Bitkilerde, mikrosatellitlerle ilgili son literatür araştırmaları, genomik kütüphanenin sadece %1'nin mikrosatellit dizilerinden ibaret olduğunu göstermiştir (Tahir et. al., 1993).

2.7.1.10. Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS)

PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesilmesiyle ortaya çıkan uzun DNA fragmentlerindeki genetik değişim şeklidir. Bunlar kodominant markırlardır.

2.8. RAPD TEKNOLOJİSİ

RAPD teknolojisi, domates, bezelye, fasulye, nohut ve diğer bitkilerde gözlenen hastalıklara karşı direnç gösteren (R) genlerin etiketlenmesinde kullanılmaktadır (Foolad et. al., 1995). Projede, önceden belirlenmiş olan RAPD markırlar, *Ascochyta blight*'a karşı nohutta bulunan ve direnç özgülü olan geni etiketlemek için kullanılacaktır. Böylece genotipin hassas veya dirençli olup olmadığını tayin etmek mümkün olacaktır

2.9. ISSR-PCR

İlk olarak bakla germplazmaları arasındaki genetik değişikliği açıklamak için kullanılmıştır. Bitki materyalindeki bant profilleri ebeveynlerdeki DNA fragmentlerinden kaynaklanmaktadır. ISSR-PCR basit ve hızlı bir tekniktir (Gilbert et. al., 1999). Mikrosatellitler, 1 veya 7 baz çifti uzunluğunda kısa nükleotid dizi tekrarlarından meydana gelmişlerdir. Bu basit dizi tekrarları bitki genomlarında olduğu gibi memelilerde ve böceklerde de bulunmaktadır. Bu dizi tekrarları türler arasında yüksek polimorfik yapı göstermektedir (Barrier et. al., 2000). Bunlar tekrarlı dizilerindeki değişim nedeniyle yüksek derecede polimorfizm göstermektedirler.

Polimorfizm, genetik analizlerde kullanmak için çok uygundur. Mikrosatellitler, yüksek çözünüme sahip genetik haritaların oluşturulmasında da kullanılan ideal markırlardır. Ayrıca, yaygın genetik hastalıkları içeren hassas bölgeyi tanımlamak içinde önemlidir. Bu markırlar, Mendel kurallarına benzer kalıtım özellikleri gösterirler. PCR ile çoğalan ürünler 18-30 bp uzunluğunda olup bitki genomlarının moleküler markırları olarak güvenilir şekilde kullanılmaktadırlar (Senior and Heun, 1993). Mikrosatellitler, genotipler arasındaki ayrımın yapılmasında da kullanılan güçlü bir metoddur (Choumane et.al., 2000).

Bitki ıslahında kullanılan ve geniş uygulama alanı olan birkaç tip moleküler markır vardır. Bunlar genetik farklılığı, genotipler arasındaki ilişkiyi, tarımsal önemi olan genlerin haritaya bağlı olarak klonlanmasını sağlamaktadırlar (Weising et.al., 1998).

2.10. MİKROSATELLİT (STMS) MARKIRLARI İLE MOLEKÜLER ISLAH

Bitkilerde lokus spesifik mikrosatellit analizi üzerine ilk çalışmalar, (1992) yılında Akkaya ve ark. tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar ilk olarak, AT ve ATT tekrarlarından yoksun olan Gen bankalarını soya fasulyesinden analiz ettiler ve lokusa özgü 6 ve 8 allel arasında bu tekrarlardan yoksun diziler bulunmuştur. STMS analizi, bitki ıslah alanlarında, popülasyon genetiği çalışmalarında ve genotip tayininde kullanılmaktadır (Mhearne, 1992).

Genom boyunca mikrosatellitlerle oluşturulmuş çok sayıdaki polimorfik bölge STMS analizini genetik haritalama için etkili bir yöntem yapmaktadır. Genom haritasında istenilen karakteri tanımlayan gene özgü olan markırlar gibi bağlantı grupları üzerine ilk çalışmalar pirinç, soya fasulyesi ve domateste yapılmıştır. Örneğin, dirençten sorumlu olan direnç markırları, ıslah programlarında markır yardımcı seçim için vazgeçilmez tekniktir (Weising et. al., 1998). Çok detaylı olan nohut haritasında 96 markır olduğu Simon and Muehlbauer tarafından 1997 yılında kanıtlanmıştır. Harita, 550 cM değerinde 9 morfolojik, 27 izoenzim, 10 RFLP ve

45 RAPD markırdan ibarettir. Genom haritalama, *C. arietinum* x *C. reticulatum* gibi kültür ve yabani nohut formlarının melezlenmesinde de kullanılmaktadır. Çaprazlama sonucu oluşan hibrit ırkların hepsi fertildir.

Moleküler markırlar, morfolojik markırlardan daha çok avantajlar sağlamaktadır. Markırlar ıslah materyali olarak tanımlanmış olabilir ve bu markırlar fenotipte etkilerini genellikle çok yavaş göstermektedirler. Moleküler markırların genotipleri çok erken gelişme safhasında gözlenebilen metodların uygulanmasıyla tanımlanabilir. Markırlar sayesinde çok sayıda genin kontrolünde olan direnç karakterleri için ıslah çalışmalarında moleküler markırların kullanımı çok yaygındır (Melchinger, 1990).

Markır yardımıyla seçim, kuraklığa veya böceklerle karşı direnç geliştirmek, dirençli ilk döllerin oluşumunu sağlamak için son derece faydalıdır. RAPD, ISSR gibi PCR'a dayalı markırlar dominant markırlar olarak tanımlanmaktadır. RFLP ve STS markırları kodominant markırlardır. Kodominant markırlar, ebeveynden gelen genleri izleme yeteneğine sahiptir (Rıbaut et.al., 1997). RAPD polimorfizmi, hem primer bölgesindeki baz değişikliklerinden (nokta mutasyonu gibi) hem de çoğaltılmış bölgedeki kromozomal değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Polimorfizm genellikle tek bir lokusta çoğaltılmış bir ürünün varlığı veya yokluğu ile tayin edilmektedir.

2.11. GENOM HARİTALAMA

Mendel kurallarına bağlı olarak ayrılan RAPD markırlar moleküler haritanın oluşturulmasında genetik markır olarak kullanılmaktadır (Williams et. el., 1990). RAPD markırlar genetik haritalama için kullanıldığında, populasyonun belli tipleri geri melezleme ve Recombinant Inbred Lines'lar F2 populasyonuna tercih edilmektedir. Tek bir RAPD bant, lokusun homozigot veya heterozigot olduğunu göstermez. Uygun moleküler teknikler ve kurallar bireye özgü genlerin çalışılması için ıslahçılara çok fırsatlar tanımaktadır.

Bu da markır yardımcımlı seçim sayesinde olmaktadır, ilgili genlerle ilişkili markırların kullanılması ve manuplasyonların yapılması gerekmektedir. Böylece önemli genlerin izolasyonu sağlanabilmektedir (Santra et.al., 1998).

Ayrıca RAPD teknolojisi, patojenik çeşitliliği çalışmak için de çok faydalıdır. İlk olarak genotip ve patojen arasındaki ilişkinin tanımlanarak patojenin izole edilmesinde de kullanılmıştır (ICARDA, 1997).

2.12. GEN ETİKETLEME

RAPD teknolojisi, domateste benek hastalığına (Martin et. el.,1991), marulda *downy mildew* hastalığına karşı direnç oluşumu (Michelmore et. al., 1991) gibi birkaç önemli karakterin oluşmasını sağlayan genleri ve bu genler içerisinden de direnç genlerini etiketlemek için kullanılmıştır. nemli genlerin etiketlenmesi, genle ilişkili olan moleküler markırın tanımlanmasıyla olmaktadır (Stuber, 1997). Moleküler markırlar ve gen allelleri arasındaki ilişki patojene direnci tayin edebilmek için şarttır.

2.13. GEN PİRAMİDİNİN OLUşMASI

Nohutta *Ascochyta blight* için çok sayıda direnç geni biraraya gelmiştir. Bu genler (Singh and Reddy, 1989) yılında rapor edilmiş ve *Ascochyta blight* patojenine karşı direnç tanımlanmıştır. Fakat bu önemli genler nohut genomunda bulunmamaktadır. Hastalık gibi diğer önemli karakterlerde çok sayıda genin kontrolü altındadır. Bitki ışlah programlarında DNA markırlarının rolleri çok büyüktür. DNA teknolojisi hızla gelişirken ışlah çalışmaları da ivme kazanmıştır. Bitki patentleme ve bitki eşitidinin artırılarak yeni kültürlerin üretimi önemli kurallara dayanmaktadır (Rheenen et.al., 1988).

Nohutta *Ascochyta blight* hastalığına karşı oluşan direncin kalıtsal olması, önemli genlerin etiketlenmesi ve kantitatif bölgenin tayin edilmesi, markır yardımıyla seçim etkinliğinin artırılması, desi ve kabuli tipler arasındaki ilişkinin belirlenmesi, yabancı formlardan kültür formlarına faydalı karakterlerin aktarılması ve haritalama çalışmaları moleküler tekniklerin uygulanması açısından son derece önemlidir.

Ürünün ıslah edilmesinde genetik markırların etkisi bazı faktörlere bağlıdır.

- Belirli çeşitler arasındaki değişimin genetik temeli,
 - Kültür germplazmlarında polimorfik olan genetik markırları tanımlama yeteneği,
 - Büyük genomların analiz edilmesinde yüksek ayırım gücüne sahip tekniklerin ve kuralların gelişmesi,
 - DNA markır teknolojisinin kolay uygulanabilmesi ve in vitro şartlarda DNA markırlarının kullanılarak genetik haritaların çıkarılması
- (Paterson et. al., 1991).

2.14. BİYOTEKNOLOJİK ÇALIŞMALAR

Bitki biyoteknolojisi tarım, gıda ve ilaç endüstrisinde önemli rol oynamaktadır. Genlerin yerlerini ve özelliklerini değiştirerek yeni transgenik çeşitlerin elde edilmesine yardımcı olmaktadır. Böylece bitkiyi etkileyen ve verimin düşmesine neden olan çevresel faktörlerin azalmasını sağlamaktadır. Bitki biyoteknolojisi, biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dirençli transgenik bitkilerin üretilmesi, ürün kalitesinin artırılması, biyoreaktör olarak transgenik bitkilerin kullanılması ve bitki genomunun genetik ıslah ve gen klonlama amaçlı kullanılması çalışmalarını hedef olarak almaktadır.

Nohutta tarladan uzak laboratuvar şartlarında transformasyon ve bitki rejenerasyonunun sağlanması için uygun metodlar geliştirilmiştir. Nohudun birden çok genotipinde, kök rejenerasyonu sağlanarak transgenik nohudun üretilmesinde rutin ve basit bir yöntemin uygulanması için üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (Kar et. al., 1996). Hastalıklara karşı dirençli olan ürünlerin elde edilmesi için bitkinin genomunda bulunan direnç genlerinin (R geni) izole edilmesi gerekir. Bu çalışmalarda biyoteknolojik yöntemleri kapsamaktadır. Bitki ıslahında biyoteknolojinin kullanılması uzun zaman, personel ve donanımlı laboratuvar ortamının sağlanmasına bağlıdır.

Rekombinant DNA teknolojisi ile transgenik bitkiler elde edilmiştir. Bunun için örneğin herbisit (böcek öldürücü ilaçlara karşı) dayanıklı bitki elde etmek için *Bacillus thurigiensis* bakterisinde bulunan plazmid kullanılır. Mantar hastalıklarına karşı koruyucu (dirençli) geni aktarmak içinde *Agrobacterium tumefaciens* (Ti) plazmidi ile inkübasyonla transformasyon sağlanır. Örneğin, transgenik domates elde edilerek raf ömrü uzun domates yapılmıştır. Domates, 2 seneden daha uzun süre Amerika da marketlerde satılmış ve uzun süre dayanıklılığını muhafaza etmiştir. Bunun için polygalacturonase geni domatese aktararak transformasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ve rejenerasyon sağlanarak yeni bir transgenik tür elde edilmiştir. Buna “Flavor Savor” domates denilmiştir. Bu ürün; rekombinant DNA teknolojisi uygulanarak üretilen ilk ticari üründür.

Geçen birkaç yıl boyunca gen transfer metodlarında korkunç gelişmeler göze çarpmaktadır. Biz, şimdi moleküler ve hücre biyolojisi numunelerinde kullanılan çok sayıda türün gelişme ve iyileştirme programları üzerinde odaklandık. Özel durumlarda (soya fasulyesi, pirinç, mısır ve keten) gen transfer metodları genotipi ve bitki çeşitliliğini geliştirmek ve sınırlamaları kaldırmak için geliştirildi. Önemli ürünler, gen transfer metodları ile daha iyi ve istenilen hale getirildi. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde yemeklik dane baklagillerin verimi ve ekim alanlarını artırmak için çalışmalar yapılmıştır.

Rekombinant DNA teknolojisinden esinlenerek yeni ürünlerin oluşumu sağlanmış, endüstri ve tüketici için yeni kaynaklar elde edilmiş ve böylece hem endüstrileşmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde ekonomik durum ilerlemiş ve ivme kazanmıştır.

Rekombinant DNA teknolojisinin çeşitli yöntemleri tarım alanında da başarıyla kullanılmaktadır. Topraktaki diğer mikroorganizmalar gibi bakterilerde bitkilerin köklerine yapışık olarak ortak yaşam (simbiosis) sürdürmekte ve havadan tutulan azottan bitki bu yolla direkt olarak faydalanabilmektedir. *Rhizobium* ile legüm'ler arasındaki ilişki bu tür bir ilişkidir. Gerek *Rhizobium*'un ıslah edilerek daha iyi duruma getirilmesi gerekse de *Rhizobium*'daki azotu tutma genlerinin klonlanarak simbiyotik ilişki içinde olan başka bakterilere aktarımı bitki genetiği çalışmaları arasındadır. Yine, bazı bakteriyel genlerin bitkilere aktarılabilmesi de mümkün görülmektedir. Özellikle Ti plazmidleri ile yapılan çalışmalar buna örnektir. Ti plazmidleri doğada *A. tumefaciens* içinde bulunmakta ve bu bakterinin kök veya gövdelerinde oluşturduğu tümörlerde bazı bakteri genleri bitki hücrelerine transfer edilebilmektedir. Son yıllarda Ti plazmidleri ile yapılan çalışmalar artarak ve bunların bitkiler için klonlama vektörü olarak kullanılmasına başlanmıştır.

Değişik türlerden elde edilen genlerin yalnızca bakteri ya da virüslere değil yüksek canlıların hücrelerine de sokulabilmesi ve bu genlerin sokuldukları hücrelerin genleriyle birleşerek eksprese olabilmeleri, bitki ve hayvanların kalıtımında değişiklik yapma imkanını gündeme getirmiştir. Bu yöntemle tarım alanında verimi yüksek, fungus ve bakteri gibi parazitlere dayanıklı bitki ve tahılların elde edilmesine çalışılmaktadır. Ayrıca, gen yapı ve haritalama çalışmalarında da biyoteknolojik yöntemlerden yararlanılmaktadır. DNA haritasının çıkarılması, DNA'nın izole edilip işaretlenebilecek parçalara ayrılabilmesi, bu parçaların ayrıntılı olarak tanımlanması ve başlangıçtaki maddenin niteliklerini yansıtan bütün bu verilerin birleşmesiyle haritaların ortaya çıkarılması işlemlerinden oluşur. Bu işlemler sırasında DNA'yı çoğaltmak için "klonlama" ve "PCR" yöntemi kullanılır (Williams et.al., 1993).

Bağlantı ya da linkage haritaları olarak da bilinen genetik haritalar, belirli bir DNA aralığında genetik markırların görece konumlarını yansıtır. Markırların aralıkları fiziksel uzaklıklarından çok kalıtsal özelliklere dayandığından çok

önemlidir. Genetik haritalama da kullanılan markırlar, nesilden nesile değişen DNA baz dizilerinden kaynaklanır. Bu markırlar, iki homolog kromozom parçasının birbirinden ayırte dılmesını ve dölden döle aktarılmasını izlemeye yarar (Hung et.al., 1999).

Genetik haritaların oluşturulma süreci, mayoz bölünme sonucu nesiller boyu aktarılan değişik markırlar arasındaki ilişkiyi sağlamayı kapsar. Eğer farklı kromozomlarda iki takım markır varsa bunlar mayoz bölünme de rastgele dağılırlar. Ancak, markırlar aynı kromozom üzerinde bulunur ve rekombinasyon da gerçekleşmezse o zaman birlikte katılırlar (yani bağılı durumdadırlar). Herhangi bir kromozom üzerinde yer alan iki markırın birbirine yakınlığı, aralarında rekombinasyon olma sıklığı ile ters orantılıdır. Rekombinasyon olaylarının sıklığı izlenerek, markırlar arasındaki genetik uzaklık ve sıralanmalar değerdendirilerek genetik haritalar yapılmaktadır. Genetik haritalamada, kullanışlı bir kalıtsal markırın temel özelliğı, bireyler arasındaki polimorfizmdir. Bu genellikle basit bir baz dizisinin DNA'nın belirli bir kesiminde tekrarlama sayısının genotipler arasında farklılık göstermesidir. Yani, kalıtsal markırın farklı türlerinin populyasyonda yaygın biçimde bulunmasıdır (Tullu et.al., 1999).

Son zamanlarda doubled- haploid, markır yardımcı seçim ve genetik transformasyon gibi biyoteknolojik metodlar geliştirilmiştir. Markırlar sayesinde önemli olan genlerin etiketlenmesi (mantara karşı direnç geni gibi) ve hastalık gibi kantitatif karakterlerin bulunduğı bölgenin tanımlanması sağlanmaktadır.

2.14.1. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu 0.5 ml'lik mikrotüplerde toplam reaksiyon hacmi RAPD ve ISSR için 25 µl, STMS için 15 µl olacak şekilde gerçekleştirildi. Hazırlanan bileşenler tüplere eklendikten sonra PCR reaksiyonlarında gerçekleştirilen yüksek sıcaklıklarda bileşenlerin buharlaşmasını engellemek için her bir tüpe 1000'lik otomatik pipetle 1 damla mineral yağ damlatıldı. Daha sonra tüpler RAPD ve ISSR için 3 saat, STMS için 2 saat thermocyler (MJ Researching, PTC 100) de PCR programına maruz bırakıldı (Şekil 2.3.).

Çift zincirli DNA

Yüksek ısı ile zincirlerin ayrılması ve soğuma ile primerlerin hedef bölgelere bağlanması,

Kalıp DNA zincirlerinden *Taq* DNA polimerazın tamamlayıcı, yeni DNA zincirleri sentezlemesi

Reaksiyon karışımının yeniden ısıtılması ile yeni sentezlenen zincirlerin ayrılması ve primerlerin hedef bölgelere bağlanması,

Taq DNA polimeraz yeni tamamlayıcı diziler sentezler fakat bu yeni diziler hedef bölgeler ile sınırlandırılmış parçalardır,

Proses tekrarlanır,

(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

(f)

(g)

Çift Zincirli Kalıp DNA

Zincirler ayrılır ve primerler bağlanır

Primerler uzatılır

Primer 2'nin tamamlayıcısı Primer 1'in tamamlayıcısı

Zincirler ayrılır ve primerler bağlanır

Yeni primerler

Primerler uzatılır

Değişken uzunluktaki zincirler Birim uzunluktaki zincirler

Zincirler ayrılır ve primerler bağlanır

Primer 2'nin tamamlayıcısı Primer 1'in tamamlayıcısı

Primerler uzatılır

Çoğaltılmak istenen parçalar (değişken uzunluktaki zincirler gösterilmemiştir)

Bu şekilde devam eder

Şekil 2.3. PCR Metodunun Şematik Anlatımı (Santra et.al., 1998)

2.14.2. GEN TEKNOLOJİSİ

2000-2001 yıllarında DNA markır teknolojisindeki ilerlemeler ile bazı ürünlerin genetik bağlantı haritaları yapılmıştır. Markırlar, kantitatif karakterlerin tayin edilmesinde moleküler ıslah için son derece önemlidir. Gen teknolojisi ile bitkilere gen aktarımı arzulanan geni taşıyan DNA'nın izole edilmesi, PCR ile istenen saflıkta ve miktarda çoğaltılması, rekombinant DNA'nın klonlanması ve klonlanan rekombinant DNA'nın aktarılması aşamalarından oluşmaktadır. Bu yönüyle genetik manipulasyon tekniklerinin en önemli iki adımını gen klonlanması ve genin bitkiye transfer edilmesi işlemi oluşturmaktadır.

Bilim adamları bitki ıslah çalışmalarında nohut, fasulye ve mercimek vb. baklagillerde gözlenen antraknoz gibi ciddi mantar hastalıklarına karşı direncin sağlanmasının ötesinde genetik bir mekanizmanın analiz edilmesi için uluslararası araştırma ağı oluşturdular. Farklı direnç genlerinin tayin edilmesinde moleküler markırları teknik olarak kullandılar.

Bitki gen teknolojisi, tanımlanmış özel bir bölgedeki genin etiketlenmesini, izolasyonunu ve klonlanmasını hedef olarak almaktadır. Bitkilerde dirençli olan genin transfer edilerek hassas olan bireyin dirençli hale getirilmesi ile transgenik ve patojenlere karşı çoklu direnç gösteren rekombinant genotipin elde edilmesi sağlanmaktadır (antraknoz hastalığına karşı direnç gösteren kültür nohudunun elde edilmesi çalışmaları gibi) (Kahl et. al., 1994). DNA markırlarından RAPD ve ISSR, STMS markırlarına göre birbiriyle yakın ilişkili olan genotipleri ayırmak ve genom analizlerinin tayin edilmesinde çoklu lokuslarda bulundukları için daha çok kullanılmaktadır. RAPD markırlar, ekonomik olarak önemli olan genlerin mevcut gene özgü markırlarla etiketlenerek tanımlanmasını sağlarlar. Çeşitli patojenlerin neden olduğu hastalıklara karşı direnci tanımlayan tüm genler için o gene özgü markırlara ihtiyaç vardır. Markıra bağlı olarak nohut germplazmında antraknoza direncin gözlenmesi için direnç geni ile ilişkili moleküler markırların test edilmesi gerekmektedir. Çalışmada antraknoza direnç geni ile ilişkili markırlar bu amaçla kullanılmıştır.

Genom araştırmalarına göre elde edilen bulgular, gen bankalarının ve özel genleri içeren moleküler bağlantı haritalarının oluşturulması konusunda korkunç derecede ilerleyen genetik bir potansiyelin varlığını göstermiştir

(Tanksley and McCouch, 1997).

Moleküler markır teknolojisi çok önemlidir. Drs. Huaan Yang ve Penny Smith, bitki ıslahında moleküler markırların etkili olarak kullanılması için yeni tekniklerin geliştirilmesinde çok hamleler yapmışlardır. Bu teknikler baklagillerde antraknoza direnç geni gibi önemli genler için moleküler markırları tesbit etmeyi de amaçlamaktadır. Böylece moleküler markırlar bu geni içeren genotiplerin seleksiyonuna yardımcı olacaktır. Bizim yaptığımız çalışma bu yönüyle de daha sonraki projelere öncülük edecektir.

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. MATERİYAL

3.1.1. BİTKİ MATERİYALİ

Bu çalışmada bitki materyali olarak kullanılan ve nohutta gözlenen *Ascochyta blight* (antraknoz) hastalığına karşı dirençli ve hassas olan nohut genotipleri Eskişehir Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü ve Ankara Merkez Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Ayrıca çalışmada kontrol için, nohut harita popülasyonunda bulunan antraknoza karşı hassas *C. reticulatum* PI 599072 ve dirençli olan *C. arietinum* FLIP 84-92C(3) gibi ebeveyn hatları Washington State University'den sağlanmıştır (Tablo 3.1).

21 hassas ve 28 dirençli nohut genotipi (13 tanesi çeşit ve 33 tanesi ıslah hattı ve hastalığa yüksek derecede hassasiyet gösteren kırmızı nohut ile harita popülasyonunun ebeveyn hatları) olmak üzere toplam 49 nohut genotipi üzerinde çalışma yapılmıştır. Proje için temin edilen sera şartları ile tarla ortamında yetiştirilen nohutların hepsi kültür nohudu olan *C. arietinum*'dur. Bunlar da genotip ve fenotip olarak homozigot olan F6 (tüm özellikleri seçilmiş ve korunmuş olan saf ırklar) bireylerinden seçilmiştir. Saksıda ve tarlada yetiştirilen herbir bireyin yapraklarından özellikle de taze genç sürgünlerden 1-2 gr'lık gruplar halinde alınarak DNA izole edilinceye kadar derin dondurucuda (-70°C'de) saklandı.

Tablo 3.1. Türkiye de Antraknoza hassas ve dirençli nohut genotipleri

Tür No	Tür	Çeşit - Hat	Antraknoz Reaksiyonu	Orjin
1	<i>C.arietinum</i>	AKN33	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	AMAE
2	<i>C.arietinum</i>	AKN42	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	AMAE
3	<i>C.arietinum</i>	AKN98	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	AMAE
4	<i>C.arietinum</i>	AKN99	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	AMAE
5	<i>C.arietinum</i>	AKN102	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	AMAE
6	<i>C.arietinum</i>	AKN144	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	AMAE
7	<i>C.arietinum</i>	AKN145	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	AMAE
8	<i>C.arietinum</i>	AKN146	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	AMAE
9	<i>C.arietinum</i>	AKN147	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	AMAE
10	<i>C.arietinum</i>	AKN148	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	AMAE
11	<i>C.arietinum</i>	AKN395	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	AMAE
12	<i>C.arietinum</i>	AKN411	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	AMAE
13	<i>C.arietinum</i>	AKN426	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	AMAE
14	<i>C.arietinum</i>	AKN568	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	AMAE
15	<i>C.arietinum</i>	87AK71114	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	ATAE
16	<i>C.arietinum</i>	ESER87	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	ATAE
17	<i>C.arietinum</i>	İZMİR92	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	ATAE
18	<i>C.arietinum</i>	MENEMEN	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	ATAE
19	<i>C.arietinum</i>	DAMLA89	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	ATAE
20	<i>C.arietinum</i>	GÖKÇE	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	ATAE
21	<i>C.arietinum</i>	KÜSMEN99	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	ATAE
22	<i>C.arietinum</i>	ER99	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	ATAE
23	<i>C.arietinum</i>	UZUNLU99	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	ATAE
24	<i>C.arietinum</i>	AKÇİN91	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	ATAE
25	<i>C.arietinum</i>	SARI98	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	ATAE
26	<i>C.arietinum</i>	AYDIN92	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	ATAE
27	<i>C.arietinum</i>	AZİZİYE94	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	ATAE
28	<i>C.arietinum</i>	AKN26	<i>Ascochyta blight</i> 'a hassas	ATAE
29	<i>C.arietinum</i>	AKN63	<i>Ascochyta blight</i> 'a hassas	ATAE
30	<i>C.arietinum</i>	AKN78	<i>Ascochyta blight</i> 'a hassas	AMAE
31	<i>C.arietinum</i>	AKN79	<i>Ascochyta blight</i> 'a hassas	AMAE
32	<i>C.arietinum</i>	AKN88	<i>Ascochyta blight</i> 'a hassas	AMAE
33	<i>C.arietinum</i>	AKN89	<i>Ascochyta blight</i> 'a hassas	AMAE
34	<i>C.arietinum</i>	AKN564	<i>Ascochyta blight</i> 'a hassas	AMAE
35	<i>C.arietinum</i>	AKN566	<i>Ascochyta blight</i> 'a hassas	AMAE
36	<i>C.arietinum</i>	AKN567	<i>Ascochyta blight</i> 'a hassas	AMAE
37	<i>C.arietinum</i>	AKN570	<i>Ascochyta blight</i> 'a hassas	AMAE
38	<i>C.arietinum</i>	AKN587	<i>Ascochyta blight</i> 'a hassas	AMAE
39	<i>C.arietinum</i>	AKN589	<i>Ascochyta blight</i> 'a hassas	AMAE
40	<i>C.arietinum</i>	AKN591	<i>Ascochyta blight</i> 'a hassas	AMAE
41	<i>C.arietinum</i>	AKN592	<i>Ascochyta blight</i> 'a hassas	AMAE
42	<i>C.arietinum</i>	AKN599	<i>Ascochyta blight</i> 'a hassas	AMAE
43	<i>C.arietinum</i>	ESKVD17	<i>Ascochyta blight</i> 'a hassas	ATAEI
44	<i>C.arietinum</i>	ESKVD18	<i>Ascochyta blight</i> 'a hassas	ATAE
45	<i>C.arietinum</i>	ESKVD45	<i>Ascochyta blight</i> 'a hassas	ATAE
46	<i>C.arietinum</i>	CANITEZ	<i>Ascochyta blight</i> 'a hassas	ATAE
47	<i>C.arietinum</i>	KIRMIZI NOHUT	<i>Ascochyta blight</i> 'a hassas	ATAE
48	<i>C.arietinum</i>	FLIP 84-92C(3)	<i>Ascochyta blight</i> 'a dirençli	WSU
49	<i>C.reticulatum</i>	PI 599072	<i>Ascochyta blight</i> 'a hassas	WSU

ESK - ATAE: Eskişehir Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü ; AMAE Ankara Merkez Araştırma Enstitüsü

WSU: Washington State University

3.1.2. MOLEKÜLER MATERYAL (PRİMERLER)

Çalışmada; RAPD (UBC733, UBC181, UBC681), ISSR (UBC836, UBC858) ve STMS (TA2, TA72, TS54, GA2, TA146) markırları kullanıldı (Tablo 3. 2, 3, 4). Bu markırlar, nohutta *Ascochyta blight*'a direnci kontrol eden QTL ile yakın ilişkili bulunmuştur (Santra et. al., 2000). RAPD, ISSR ve STMS primerleri, analizlerin yapılabilmesi için Invitrogen firmasına sentezlettirilmiştir. Farklı nükleotid uzunluğunda 10 farklı primer kullanılmıştır. Stok primerler dondurucuda (-20°C'de) saklandı ve stok primerlerden rutin çalışmalarda kullanmak üzere çalışma primerleri hazırlandı.

Tablo 3.2: Nohutta *Ascochyta blight*'a dirençten sorumlu olan genlerle ilgili mikrosatellit (STMS) markırlar

Markır (STMS)	Primer-Dizisi (5' → 3')	Molekül Ağırlığı (bp)
GAA47	CACTCCTCATGCCAACTCCT/ AAAATGGAATAGTCGTATGGGG	169
GA2	TGCATTGGAAATACAGCATGA/ AATTTTGGTTCGCCACAAAC	144
TA2	AAATGGAAGAAGAATAAAAACGAAAC/ TTCCATTCTTTATTATCCATATCACTACA	175
TA72	GAAAGATTTAAAAGATTTTCCACGTTA/ TTAGAAGCATATTGTTGGGATAAGAGT	256
TA146	CTAAGTTTAATATGTTAGTCCTTAAATTAT/ ACGAACGCAACATTAATTTTATATT	161
TS54	TACAAGTTAAAATGAATAAATATTAATA/ GAAATTTAGAGAGTCAAGCTTTAC	209

Tablo 3.3: Nohutta *Ascochyta blight*'a dirençten sorumlu olan genlerle ilgili RAPD markırlar

Markır (RAPD)	Primer Dizisi (5' → 3')	Moleküler Ağırlık (bp)
UBC733	GGGAAGGGAG	925
UBC181	ATGACGACGG	1850
UBC681	CCCCCGGACT	1750

UBC: University of British Columbia

Tablo 3.4: Nohutta *Ascochyta blight*'a dirençten sorumlu olan genlerle ilgili ISSR markırlar

Markır (ISSR)	Primer Dizisi (5' → 3')	Moleküler Ağırlık (bp)
UBC836	(AG) ₈ YA Y=C veya T	700
UBC858	(TG) ₈ RT R=A veya G	1400

3.2. METOD

3.2.1. GENOMİK DNA İZOLASYONU

3.2.1.1. Miniprep Tekniği

Nohudun yaprak dokusunun genç sürgünlerinden genomik DNA izolasyonunda Doyle and Doyle (1987) ve Mayer at.al. (1997) tarafından önerilen yöntemler uygulandı.

DNA izole etmek için tarladan toplanan nohut çeşitlerinden elde edilen nohut yaprak numuneleri derin dondurucudan (-70°C) alınır. Sonra, numuneler sıvı nitrojen kutusu içine konur. Yani numunelerin ezme işlemi sırasında bir kısmı işleme tabii tutulurken bir kısmı sıvı nitrojen içinde tutulur. Böylece yaprakların tarladaki tazeliğini halen koruması sağlanır. Ezme işleminde kullanmak üzere havanda yaprak eksplantını ezmek için sıvı nitrojen kullanılır.

- Benmari 65°C 'ye ayarlanır.
- Ependorf tüpler hazırlanır ve etiketlenir.
- Havanda yapraklar sıvı nitrojen ile ezilerek parçalanır.
- Herbir yaprak herbir tüpe ayrı ayrı konur.
- Herbir tüpe öncelikle 7.5 ml soğuk ekstraksiyon buffer konur, tüpler sallanır.
- Bu karışımın üzerine 7.5 ml nüklei-lizis buffer ve 3 ml sarkosyl konur, kapakları kapatılır.
- 65°C 'ye ayarlanmış benmariye tüpler konur ve 1 saat beklenir.
- Tüpler benmariden alınır ve birkaç dakika soğumaya bırakılır. Herbir tüpe 18 ml chloroform ilave edilir.
- Tüpler 15 dakika 9500 devirde santrifüj edilir. Santrifüj edilen tüplerin yüzeyinde yani üst kısmında kalan sıvı kısım pipetle çekilerek steril tüplere aktarılır. 15 ml chloroform daha ilave edilir.
- Tekrar 10 dakika santrifüj edilir. Bu tüplerin (aktarılmış) üzerine tüp içindeki sıvının 2 katı etilalkol konur, yavaşça sallanır ve -20°C 'ye konur.
- -20°C 'den tüpler alınır, tekrar 10 dakika 9500 devirde santrifüj edilir.
- İçinde DNA bulunan tüplere ayrı ayrı etilalkol solüsyonu dökülür, 1 saat bekletilir (Etilalkol, tüpün dibine yapışan DNA'nın kalkması yani dibe yapışmamasını sağlar).

- Tüpler 37 °C' de 20-30 dakika ters çevrilerek pellet DNA kurutulmadan etilalkolün uzaklaştırılması sağlandı. Etilalkolü uzaklaştırılan pellet DNA bulunan tüplerin herbirine 5'er ml TE buffer konur. DNA iyice süspanse oluncaya kadar beklenir.
- Sonra tüpler 60 °C'de benmariye konur.
- Tüp içerisindeki TE'de eriyen DNA'lar küçük steril ependorf tüplere aktarılır.
- RNA'yı uzaklaştırmak için her tüpe 5 µl RNase eklenir.
- Benmariye 60 °C'de konur, 20 dakika beklenir.
- +4 °C'de muhafaza edilir.

3.2.1.2. Mikroprep Tekniği

Bu metod; bitkilerde AFLP, RFLP, veya STMS analizleri yapmayı planlamıyorsanız ve tek bitki de yani yalnızca bir bitkide RAPD analizi yapmayı düşündüğünüz projeler için idealdir. Bu protokol, taze dokunun birkaç miligramından birkaç mikrogram DNA izole etmeyi sağlar. Bu, RAPD analizlerinin yüzlercesi için yeterli DNA miktarıdır. Bu metodla RAPD analizi, diğer izolasyon metodlarına göre daha çok ürün (DNA) meydana getirir.

- Ekstraksiyon buffer hazırlanır.
- Su banyosunun içi su ile doldurup sıcaklık 65 °C'ye ayarlanır.
- Numune sayısı kadar ependorf tüp alınır ve numaralandır.
- Toplanılan numuneleri koymak için, içi buz dolu küvet temin edilir..
- 1.5 ml'lik ependorf tüpler içerisine taze doku numuneleri (yaprak) toplanır ve herbir tüp buz küvetine ağzı kapalı olarak yerleştirilir.
- En verimli ve çok DNA izolasyonu genç sürgün ve yapraklardan sağlandığı için seradaki (bitki şartlandırma odası) en genç yapraklar toplanıp tüplerin içine konur. Tüp içine konulan yapraklar ekstraksiyona kadar buz içinde muhafaza edilir.
- Sonra herbir tüpe %0.4 beta-mercaptoetanol konur (beta-mercaptoetanol, disülfid bağlarını kırar).
- Numune tüpleri içerisine 50 µl buffer konur ve öğütülür.
- Tüpe tekrar 450 µl daha buffer konur.
- Numuneler, 65 °C'ye ayarlanmış su banyosuna konur ve 1.5 saat bekletilir.

- Numuneler benmariden alınır ve birkaç dakika soğumaya bırakılır.
- Herbir tüpe 700 µl chloroform-isoamyl-alcohol konur.
- Herbir numune vortexte karıştırılır.
- 12000 devirde 5 dakika santrifüj edilir.
- Laminar flow- steril kabin içinde herbir tüpe 600 µl chloroform ilave edilir.
- Numune tüpleri vortekste karıştırılır.
- 3 dakika 12000 devirde santrifüj edilir, üst kısmı başka tüpe aktarılır, ve tüpün tabanında kalan küçük tortu yani DNA olduğu sanılan materyalin dökülmemesine dikkat edilir.
- Elimizdeki 400-500 µl'lik tüpe (numune) herbir tüp için 1 ml soğuk etanol konur ve 15 dakika bekletilir (%75'lik etilalkolden 800 µl).
- Tüpler kapatılıp ileri-geri sallanır ve numunelerin karışması sağlanır, tüpün tabanında genişçe bir DNA lobu (pellet) görülebilir.
- Numuneler -20 °C'ye konur.
- Tüpün tabanında tortu oluşması sağlanır ve numuneleri %75'lik etilalkol ile yıkanır ve kurutulur.
- DNA'yı etilalkolden uzaklaştırıp tüpler steril kabin içerisindeki kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek konur ve 1 gün kuruması beklenir. DNA kuruduktan sonra 100-200 µl steril TE buffer içeren tüpe konur. İçerisinde pellet DNA bulunan tüpe sonra 1 µl RNase (10 mg/ml) / 100 µl TE konur.
- Benmarinin sıcaklığını 60 °C'ye düşürüp 20 dakika benmaride tutulur. Sonra numuneler PCR' dayalı analizlerde kullanılmak üzere +4 °C'ye konur.

3.2.2. İZOLE EDİLEN DNA KONSANTRASYONLARININ TAYİNİ

Bu DNA solüsyonlarındaki DNA miktarı tayini ve polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılacak DNA miktarına uygun sulandırım oranlarının belirlenmesi için U.V. spektrofotometre de spektrofotometrik ölçümler yapıldı. HPLC H₂O ile yapılan 1/5, 1/10, 1/100 ve 1/200' lük sulandırmaların U.V. spektrofotometrede 260 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerlerine bakılarak PCR'a dayalı RAPD, ISSR ve STMS analizleri için kullanılacak olan çift zincirli DNA molekülünün konsantrasyonları hesaplandı. DNA konsantrasyonları hesaplanırken ,

OD₂₆₀ X 50 X Seyreltme katsayısı (oranı)

(Maniatis et. al.,1982) formülü kullanıldı. Ayrıca, kalite jeli yapılarak DNA konsantrasyonları net olarak tayin edildi. Polimeraz zincir reaksiyonu için sulandırmaları yapılan genomik DNA örnekleri -20 °C'de saklandı.

Sulandırma da tüp içerisindeki numune 100 µl'ye tamamlanır. Herbir numune için yapılan farklı sulandırma konsantrasyonuna örnek;

1:5 sulandırma	20 µl DNA
	20 µl TE buffer, PH=8
	60 µl HPLC H ₂ O

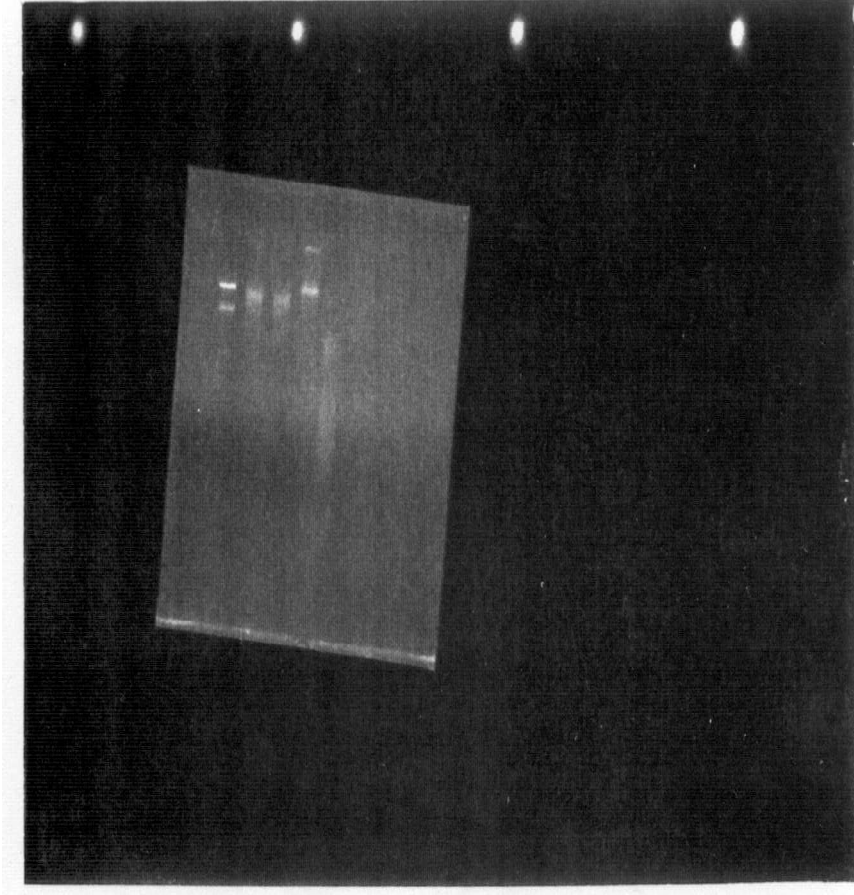
3.2.2.1. Agaroz Jel Elektroforez (Kalite Jeli)

Agaroz, bir kırmızı alg türü olan *Agar agar*'dan izole edilen doğrusal bir polisakkarittir. Agaroz sıcak suda çözünür ve soğutulduğu zaman polimerde karşılıklı hidrojen bağlarının oluşumu ile jel yapısı oluşur. Bu oluşum geri dönüşümlüdür. Agaroz konsantrasyonu %0.5-1.5 arasında değiştirilerek jelin por çapı ayarlanabilir. Böylece, küçük DNA fragmentleri için yüksek, büyük DNA fragmentleri için düşük agaroz konsantrasyonu kullanılarak DNA'nın jelde uygun şekilde yürütmesi sağlanabilir. DNA'nın jelde görünür hale gelebilmesi etidyum bromürün DNA bağları arasına bağlanarak 300 veya 360 nm'de ışığı absorblaması sonucu fluoresan etki göstermesi ile olur.

Bu etki DNA konsantrasyonuna bağlı olarak kuvvetli veya zayıf olabilir. Uygulamalarda genellikle 0.1-0.5 µg/ml EB konsantrasyonu kullanılır. İzole ettiğimiz

DNA'lar, keskin bir bant ile bu bandın aşağı ve yukarı kısmına doğru biraz yayılan bir görüntü vermektedir.

Polimeraz zincir reaksiyonunu uygulamadan önce izole edilen genomik DNA'nın konsantrasyonunun ayarlanması gerekmektedir. Bunun için %1'lik kalite jeli hazırlanır. %1'lik kalite jeli için 1 gr agaroz tartılıp 100 ml 1 X TBE tamponu içinde mikrodalga fırında eritildi. Tamponun sıcaklığının yaklaşık 55-50°C'ye düşmesi beklendi. Sonra agaroz elektroforez tankı trayine döküldü. 15-20 dakika sonra donan jelin tarakları çıkarılarak herbir kuyucuğuna 10 µl TBE buffer (1xTBE), sulandırılmış 5 µl DNA ve 5 µl Blue juice yüklenir. Son kuyucuğa ise 10 µl Lamda DNA markır EcoRI HindIII digest markır yüklenerek agaroz jel elektroforez uygulanır. Jel koştuktan sonra önceden hazırlanmış EtBr içerisine konur ve orada 10 dakika bekletilir. Sonra steril saf suda 15 dakika bekletilip UV.'de görüntülenerek, fotoğraflanır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. AgaroZ Jel Elektroforez (Kalite Jeli)

3.2.3. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) esaslı moleküler markır teknikleri en çok kullanılan tekniklerdir (Şekil 2.3). Bu yöntem; bir organizma veya mutant gene ilişkin normal ya da parçalanmış DNA ya da RNA'nın in vitro çoğaltılmasına imkan veren yöntem olup (Mullis et. al., 1986) te keşfettiği bir nükleik asit sentez yoludur. In vitro bir metod olan PCR, ısıya ayarlı DNA polimerazların kullanımı ile yapılan çoğaltımların otomasyonunu sağlamıştır (Saiki et. al., 1985).

PCR yöntemi kısaca bir gen ya da DNA bölgesinin, bu hedef bölgenin uç bölgelerine bağlanan oligonükleotid primerler aracılığıyla bir dizi replikasyon geçirerek çoğalması işlemidir. PCR'ın gerçekleştirilmesi için ortamda üç nükleik asit bileşen, amplifike olacak çift DNA fragmenti ve iki adet tek sarmallı oligonükleotid ve bunlara ek olarak bir protein bileşeni olan DNA polimeraz enzimi, uygun deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTPmix) bir tampon ve tuz solüsyonlarının bulunması gerekir. Reaksiyondaki her döngü 3 evreden oluşmaktadır.

Çoğaltılacak DNA parçası kalıp dizi adını alır. Çoğaltım kalıp dizinin tamamlayıcısı olan, oligonükleotid primerler aracılığı ile yapılır. Öncelikle kalıp DNA, yüksek ısı ile denatüre edilir (çift ipliğin açılması), ardından ısının düşürülmesi ile hedef dizilere uygun primerler bağlanır ve ısının tekrar yükseltilmesi ile ısı döngüleri aracılığıyla aktive edilen DNA polimeraz, kalıp DNA'ya bağlanmış primerlere nükleotid eklenmesini sağlar. Bu ısı değişikliklerinin tümü bir döngüyü oluşturur ve bu döngüler birçok defa tekrar edilir. (Örneğin: RAPD için 40 döngü). Bu şekilde ürün miktarı artmaya başlar. Her döngü sonunda yapay olarak oluşan yeni ürünler (diziler) kalıp zincirin tamamlayıcısı durumundadırlar ve oluşan bu her yeni DNA zinciri aynı anda kalıp vazifesi de görürler. Çoğaltımın başarısı primerlerin bağlanma kabiliyetine, hassasiyetine ve evvelki döngü içinde bulunan hedef DNA'nın birden fazla sentezlenme miktarına bağlıdır. Sonuçta, "n" başarılı çoğaltım döngülerinin sayısı iken yaklaşık olarak 2^n , çoğaltılan parçanın üs rakamı cinsinden artım miktarını gösterir (Saiki, 1990).

PCR uygulamalarında standart ısı uygulamasını sağlamak amacıyla her döngü için gerekli ısıyı düzenli olarak ayarlayan thermocyclers denilen otomatik aletler geliştirilmiştir. PCR uygulamalarının amacı az miktardaki bir materyalde özgül bir gen veya gen bölgesini çoğaltmak ve daha detaylı incelemeler için yeterli genetik materyal sağlamak olduğundan; PCR yöntemiyle yeterli ürün elde edilip edilmediğinin araştırılması ve ürünün tanımlanması restriksiyon analizleri ve nükleik asit hibridizasyon teknikleri kullanılarak gerçekleştirilir.

PCR ile çoğaltılan DNA fragmentlerini inceleyebilmek için uygun bir RE ile kesim yapılır. Jel elektroforezinde yürütülerek DNA fragmentleri birbirinden ayrılır. Sonra bu fragmentler Ethidium bromid ile boyanarak incelenir. U.V. ışığı altında doğrudan yapılan incelemelerde siyah zemin üzerinde beyaz polimorfik bandlar gözlenir.

PCR yönteminin uygulanabilmesi için öncelikle tam doğru bir baz dizisi bilgisine ihtiyaç duyulmaktadır. Yöntemin son derece duyarlı olması nedeniyle çok küçük miktarlardaki kontaminasyon bile yanlış sonuçlara neden olabilmektedir. PCR çalışmalarında diğer bir dezavantaj ise her primer çiftinin kendine özgü annealing ve uzama koşullarının olmasıdır. Bu koşullar; ısı, siklus uzunluğu, primer yoğunluğu, Mg^{++} konsantrasyonu, enzim ve DNA miktarı olarak sıralanabilir.

3.2.3.1. PCR Amplifikasyonu ve RAPD Analizi ile Genom Parmak İzlerinin Çıkarılması

Antraknoza hassas ve dirençli olan harita populasyonun iki ebeveyn hattı ve 47 nohut genotiplerinin yapraklarından izole edilen genomik DNA'lar (Simon and Muehlbauer, 1997; Ratnaparkhe et. al., 1998) tarafından önerilen RAPD yöntemi ile, nohut genom haritasında antraknoza dirençli gen ile yakın ilişkili olan veya aynı lokusta olduğu belirtilen 10 nükleotidden oluşan primerler kullanılarak genomun belirli bölgeleri çoğaltılarak markır yardımlı seçimde kullanmak üzere direkt ilgili olan markırı tayin edebilmek için hassas ve dirençli olan 49 genotipin genomik

parmakizleri çıkartıldı ve analiz edildi. RAPD ve ISSR analizlerinde yöntem aynıdır, fakat kullanılan primerler farklıdır.

RAPD PCR’da, Bir Örnek İçin Numune Hazırlama

2.5 µl 10xbuffer (-MgCl₂)

2.5 µl 10xNukes (Nukleotidler-dNTP- dATP, dCTP, dTTP, dGTP)

1.5 µl MgCl₂

0.4 µl primer (UBC733, UBC181, UBC681)

0.2 µl Taq DNA polimeraz

12.9 µl HPLC H₂O

+

5 µl DNA

Tüp içerisinde hazırlanan karışımdan 20 µl mikrotüplere dağıtılır. Sonra herbir mikrotüpe örneklerden izole ettiğimiz DNA’lar (5 µl) ilave edilir. Sonra 1000’lik pipetle birer damla PCR tüplerine mineral oil damlatılır. Mikrotüplerin kapakları kapatılıp PCR için (numunelerin DNA amplifikasyonunun sağlanması için) PCR makinasına (PTC-100 thermocycler – MJ Research, USA) konur. RAPD-PCR programı ayarlanarak 40 döngü yaptırılır. PCR makinasından alınan PCR ürünleri, 1XTBE kullanılarak hazırlanmış olan %2’lik agaroz jelde elektroforetik olarak ayrılır (Sambrook et. al., 1989). Jele yüklenmiş olan PCR ürünlerinin herbirine 5 µl Blue juice boya damlatılır. Sonra pipetle karıştırılır ve tüp içerisindeki mineral oil’i almamaya çalışarak herbir numune pipetle önceden hazırlanmış jele yüklenir. Birinci kuyucuğa *PBR322 DNA BstN1 digest RAPD markır* (6 µl) yüklenir, son kuyucuğa kontrol olarak DNA yerine 5 µl HPLC H₂O konur. Ayrıca, 47 genotipten başka diğer iki kuyuya da FLIP 84-92(3) ve PI 599072 konur. Eğer kullanılan primer dirençliliğe özgü markır ise dirençli genotiplerde ve FLIP 84-92C(3) olan ebeveynde bant gözlenirken hassas genotiplerde ve PI 599072 hassas ebeveyn hattında bant gözlenmeyecektir. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra jel, elektroforeze tabii tutulur. Bunun için, 105 volt, 52 amper olan güç kaynağında jelin 3 saat koşması

sağlanır. Sonra jel dikkatli şekilde alınarak 10 dakika ethidium bromide içerisine konarak bekletilir.

Jel boyandıktan sonra 15 dakika saf su da bekletilir, bandların varlığı veya yokluğu UV-transilluminatör ile bakılarak tayin edilir. Jel, Polaroid 667 siyah-beyaz film kullanılarak fotoğraflanır (Polaroid, Cambridge, USA). Jel’de tek tek parlak bant diziliminin görülmesi gerekir.

RAPD-PCR (40 cycle)

25 µl /reaksiyon

Denaturasyon

94 °C 20 dakika

Primer Bağlama

36 °C 1 dakika

Uzama

72 °C 1 dakika

72 °C 8 dakika

Reaksiyon biter

4 °C

3.2.3.2. PCR Amplifikasyonu ve ISSR Analizi ile Genom Parmak İzlerinin Çıkarılması

UBC801 ve UBC900 arasındaki primerler ISSR olarak belirtilir. Baz dizilimi, 10 nükleotidden fazla ise ISSR'dır. ISSR-PCR'da, RAPD programında hazırlanan reaksiyonlar ile işlem sırası aynıdır. RAPD'den farkı ise, ISSR'da STMS gibi reaksiyon 35 döngü de biter.

ISSR PCR'da, Bir Örnek İçin Numune Hazırlama

2.5 µl 10xbuffer (-MgCl₂)

2.5 µl 10xNukes (Nukleotidler-dNTP- dATP, dCTP, dTTP, dGTP)

1.5 µl MgCl₂

0.4 µl primer (UBC836, UBC858)

0.2 µl Taq DNA polimeraz

12.9 µl HPLC H₂O

+

5 µl DNA

ISSR-PCR (35 cycle)

25 µl /reaksiyon

96 °C 2 dakika

94 °C 1 dakika

50 °C 1 dakika

72 °C 2 dakika

72 °C 8 dakika

Reaksiyon biter

4°C

3.2.3.3. PCR Amplifikasyonu ve STMS Analizi ile Genom Parmak İzlerinin Çıkarılması

Primerler 22 ile 32 nükleotid uzunluğunda olup genomun rastgele bölgeleri çoğaltılarak bireylerin genomik parmakizleri çıkartıldı ve analiz edildi.

STMS-PCR'da, Bir Örnek İçin Numune Hazırlama

10xThermophilic buffer	2 µl
10xNukes	4 µl
10xprimer 1	2 µl
10xprimer 2	2 µl
MgCl ₂	1.2 µl
Taq DNA polimeraz	0.3 µl
HPLC H ₂ O	3.5 µl
+	
5 µl DNA	

Tüp içerisinde hazırlanan karışımdan 15 µl mikrotüplere dağıtılır ve üzerlerine herbiri için ayrı olarak 5 µl DNA konur, kontrole DNA yerine 5 µl HPLC H₂O konarak her tüpe 1000'lik pipetle mineral oil eklenerek tüplerin ağızları kapatılır. Mikrotüpleri STMS-PCR programına ayarlanan PCR makinasına (PTC-100 thermocycler – MJ Research, USA) yerleştirilerek, 35 döngü yaptırılır. PCR makinasından alınan STMS-PCR ürünlerinin herbirine 5 µl blue juice boya damlatılır ve karıştırılarak herbir tüp hazırlanan jele yüklenir. İlk kuyucuğa *PBR322 DNA BstN1 digest RAPD markır* (6 µl) konur, son kuyucuğa da kontrol yüklenir. Ayrıca, 47 genotipten başka diğer iki kuyuya da FLIP 84-92(3) ve PI 599072 konur. Eğer kullanılan primer dirençliliğe özgü markır ise dirençli genotiplerle, FLIP 84-92C(3) olan ebeveynde aynı hizada bant gözlenirken hassas genotiplerle, PI 599072 hassas ebeveyn hattında aynı hizada bant gözlenecektir. Yani, hassas genotiplerle dirençli genotipler farklı hizalarda bant dizilimi göstereceklerdir.

Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra jel, elektroforeze tabii tutulur. Bunun için, güç kaynağı 104 volt, 104 amper ve 2 saate ayarlanır. Sonra jel dikkatli şekilde alınarak 10 dakika ethidium bromide içerisinde konarak bekletilir. Jel boyandıktan sonra 15 dakika saf su da bekletilir, bandların dizilimi ve oluşan polimorfizm UV-transilluminatör ile bakılarak tayin edilir. Jel, Polaroid 667 siyah-beyaz film kullanılarak fotoğraflanır (Polaroid, Cambridge, USA). STMS-PCR’da, jelde tek bant (kalın ayrı lokus) gözlenir.

STMS-PCR (35 cycle)

20 µl /reaksiyon

96 °C	2 dakika
96 °C	20 saniye
55 °C	50 saniye
60 °C	50 saniye
60 °C	5 dakika

Reaksiyon biter

4 °C

4. BULGULAR

4.1. DNA İZOLASYON METODUNUN BELİRLENMESİ

Nohut yapraklarından DNA izolasyonu, Mikroprep metodu ve Miniprep metodu uygulanarak yapılmıştır. Fakat, Mikroprep metodu diğer yönteme göre daha az materyal kullanarak yüksek kaliteli, temiz ve daha çok numune (DNA) elde edilmesi açısından son derece önemlidir. Bu metod; DNA izolasyonu için hangi canlı olursa olsun hepsinde yaygın olarak kullanılabildiği gibi izole edilen DNA -20° C’de saklandığında en az 2 yıl kullanılmaktadır. Bu yöntemle izole edilen DNA’ların DNA miktarı tayini ve polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılacak DNA miktarına uygun farklı sulandırım oranları denenmiştir. Ayrıca, U. V. spektrofotometre’de spektrofotometrik ölçümler yapıldı. Fakat tüm numuneler için en etkili sulandırım oranının 1/5 olduğu tayin edilmiştir.

Mikroprep metodu ile DNA izolasyonu yapıldıktan sonra PCR’da kullanmak üzere izole edilen DNA konsantrasyonunu belirlemek için kalite jeli hazırlanarak elektroforetik yöntemle her bir numunenin agaroz jel elektroforezde yürütülmesi sağlanmıştır.

4.2. PCR KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU

PCR’ın temel bileşenleri, kalıp DNA molekülü (izole edilen genomik DNA), DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tampon, MgCl₂ ve HPLC H₂O’dur. Polimeraz zincir reaksiyonu; RAPD, ISSR ve STMS için ayrı ayrı optimize edilmiştir. Çünkü RAPD ve ISSR’da kullanılan primer (UBC733 veya UBC836 gibi) konsantrasyonları aynı ve tek olmasına rağmen STMS’de primerlerin konsantrasyonları farklı olup iki primer (TA2₁ ve TA2₂ gibi) kullanılmaktadır.

Ayrıca RAPD reaksiyonu 40 döngüde tamamlanmasına rağmen ISSR ve STMS reaksiyonları 35 döngüde tamamlanmıştır. Bu nedenle PCR aleti (Thermal Cycler) farklı programlarda optimize edilmiştir.

Kalıp DNA Konsantrasyonu

PCR' a dayalı teknikler olan RAPD, ISSR ve STMS uygulamalarında en önemli değişkenlerden biri genomik DNA konsantrasyonudur. Yapılan bu çalışmada en iyi sonucun elde edildiği genomik DNA konsantrasyonları, RAPD ve ISSR için 20-25 ng, STMS için 50 ng olarak belirlenmiştir.

Polimerazlar

DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğe tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orjinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfattan uzun polinükleotid zincirin sentezini kataliz ederler. Bu enzimler, sentezi başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına (primerlere) gerek duyarlar. Sentezin yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmalarıyla, fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır. PCR reaksiyonları için tavsiye edilen *Thermus aquaticus*'dan elde edilen Taq DNA polimeraz enzim konsantrasyonu yapılan çalışmada RAPD ve ISSR için 1 ü/µl; STMS için 0.4 ü/µl olarak denenmiş ve bu miktar enzim amplifikasyonu sağlamıştır.

Primerler

Oligonükleotid primerler, primer sentezi yapan laboratuvarlardan elde edilmiştir. Gen çoğaltılması dahil PCR'ın birçok uygulaması için kalıp DNA'ya tamamen tamamlayıcı olan primere gereksinim vardır. Genel olarak kullanılan kalıp ile yüksek oranda bağlanma sağlamak üzere primerler 20-30 nükleotid uzunluğundadır. Fakat bu çalışmada nohut genom haritasında önceden tesbit edilmiş olan ve nohut antraknozuna karşı direnç gösterebilecek yani direnç genine yakın bulunan özel primerler, markır olarak kullanılmıştır. Çünkü çalışmada bu markırların

dirençliliğe özgü olup olmadığını tayin etmek amaçlandığı için farklı uzunlukta nükleotidlerden ibaret olan primerler kullanılmıştır. Primer konsantrasyonları yaklaşık olarak 0.1 ve 0.2 μM arasında optimumdur (Williams et. al., 1990). Daha yüksek primer konsantrasyonları yanlış bağlanmayı, özgün olmayan ürünün yığılmasını destekleyebilir ve primer-dimer yapısı olarak adlandırılan kalıptan bağımsız istenmeyen ürünlerin oluşma olasılığını arttırabilir. Bu nedenle primer konsantrasyonları çok iyi ayarlanmalıdır. Yapılan bu çalışmada primer konsantrasyonu RAPD ve ISSR için 0.24 μM , STMS için 2 μM olarak kullanılmış ve bu miktar ile amplifikasyon sağlanmıştır.

Deoksiribonükleotid Trifosfat (dNTP) Konsantrasyonu

Deoksiribonükleotid trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) yüksek saflıkta dördü karşım halinde ticari olarak sağlanmıştır. Taq DNA polimeraz düşük dNTP konsantrasyonlarında (10 – 100 μM) kalıba uygun doğru bazları seçmede daha başarılı olmakla birlikte, normal koşullarda PCR 100 μM dNTP konsantrasyonu ile gerçekleştirilir. Fakat optimal dNTP konsantrasyonu; MgCl_2 konsantrasyonuna, reaksiyon koşullarına, primer konsantrasyonuna, çoğaltılmış ürünün boyuna, PCR döngü sayısına bağlıdır (Williams et. al., 1990). Yanlış bağlanma hatalarını azaltmak için 4 dNTP’de eşit konsantrasyonlarda kullanılmalıdır. Nohut genotiplerinin amplifikasyonunda bu çalışmada her bir dNTP için, RAPD ve ISSR reaksiyonlarında 100 μM , STMS’de 250 μM olarak denenmiş ve bu miktarların amplifikasyon için yeterli olduğu görülmüştür.

Magnezyum Konsantrasyonu ve Tamponlar

Magnezyum konsantrasyonu; primer bağlanması, kalıp ve PCR ürünlerinin her ikisinde dizi ayrılma sıcaklıklarını, ürün özgünlüğünü, primer-dimer yapıların oluşumunu, enzim aktivitesini etkileyebilir. Bu nedenle MgCl_2 ’ün PCR’ın özgüllüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır. Genellikle optimum MgCl_2 konsantrasyonu olarak 1.0-1.5 mM’lık değerler tercih edilmektedir. Bu çalışmada RAPD, ISSR ve STMS için amplifikasyonu en iyi sağlayan MgCl_2 konsantrasyonu 1.5 mM olarak belirtilmiştir. Tampon olarak en çok kullanılan Taq enzimine özgü

olan tampondur. Tamponlar genellikle enzimle birlikte 10x konsantrasyonda sağlanabilmektedir. RAPD ve ISSR’da 25 µl, STMS’de 20 µl tampon kullanılmıştır.

4.3. NOHUT GENOTİPLERİNİN GENOMİK PARMAKİZİ’NİN ÇIKARILMASI

4.3.1. RAPD, ISSR VE STMS MARKIR SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

PCR’a dayalı olarak yapılan RAPD, ISSR ve STMS reaksiyonları sonucunda elde edilen PCR ürünleri % 2’lik agaroz jel hazırlanarak elektroforeze tabii tutuldu. RAPD, ISSR ve STMS Agaroz Jel Elektroforez’de iyi yürüdü. Oluşan bant profilleri herbir reaksiyon için ayrı ayrı gözlenip fotoğrafları çekilerek rapor edildi.

4.3.1.1. PCR ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi (%2’lik jel)

Polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünleri %2’lik jel kullanılarak analiz edildi. %2’lik boyama jeli için 2 gr (1 gr Nusieve agaroz+ 1 gr Seakem agaroz) agaroz tartılıp 200 ml 1XTBE içinde mikrodalga fırında iyice eritildi. Tamponun sıcaklığının 55-60 °C’ye düşmesi beklendi. Jelin donması için 15-20 dakika beklendi. Donan jel içinde 1XTBE tamponu bulunan elektroforez tankına alındı.

PCR makinasından alınan PCR ürünlerinin herbirine 5 µl Blue juice boya damlatılarak jelde görüntü elde edilmesi sağlanır. RAPD ve ISSR için 25 µl, STMS için de 20 µl olan PCR ürünlerinin tamamı ayrı ayrı (herbir kuyucuğa) %2’lik jele yüklendi. Hazırlanan jele numunelerle birlikte markır DNA olarak Ladder (1 kb) DNA yüklendi. Ayrıca, RAPD ve ISSR’da 105 volt, 52 amper’de 2.5 saat, STMS’de ise, 104 V ve 104 A’de 2 saat yürütüldü. U.V. ışık altında gözlenen, polimeraz zincir reaksiyonu sonucu oluşan bantların fotoğrafı polaroid 667 siyah-beyaz film kullanılarak çekildi.

U. V. ışığında görülebilmesi için jel ethidium bromür ile şu şekilde boyandı.

- 460 ml distile suya ½ ethidyum bromür stoktan (10 mg/ml) 20 µl bir kaba eklendi. Jel kabın içine konulup 30 dakika bekletildi.
- İçine ½ ethidyum bromür stoktan 5 µl daha ilave edilip 15 dakika bekledikten sonra su döküldü.
- Tekrar 460 ml distile suya ½ ethidyum bromür stoktan 15 µl eklendi ve jel 10 dakika bu solüsyonda bekletildi.
- İçinde ethidyum bromür bulunan küvetten alınan jel distile suda iyice yıkandı ve 30 dakika suda bekletildikten sonra U.V. transillüminatör ile bant profilleri gözlendi.

4.3.1.2. RAPD, ISSR VE STMS BANT PROFİLLERİ

Moleküler markırlar, kromozomal bölgeleri belirlemek, haritalamak ve nohutta *Ascochyta blight*'a direnç genetiğini tanımlamak için kullanılmaktadır. Ayrıca bu markırlar ıslah programlarında sürekli direnç kazanmış nohut kültürlerinin elde edilmesi ve gen (dirençli gen topluluğu) piramidi oluşumunu sağlamaktadır. Markırlar, hassas kültürlere bir ara bağlantı olarak dirençli olan gen bloğunu transfer etmek için kullanılır. Uygun olan markır jelden alınır ve vektör olarak belirlenen plazmide aktarılır. Plazmid ve markır fragment kompleksi bakteriye aktarılır, primer ile gen izole edilir, transformasyon uygulanır.

RAPD markırlar ıslah materyallerinde (hastalığa dirençli nohut germplazmında) indirek seçim kolaylığı sağlar. Dirençli genin varlığı hassas veya dirençli fenotipi tanımlamak için inokülasyona gerek kalmaksızın markır vasıtasıyla seçilmesini sağlamış olur. Islah programında dirençli genler, markırlarla çoğaltılmış bölgenin varlığı veya yokluğu ile ifade edilmektedir. Eğer, direnç bantın yokluğu ile ilgili ise yani direnç bant olmamasına bağlı ise, segregasyon popülasyonunda bantın varlığı ile ilgili olarak direnci tayin etmek mümkün olacaktır. Dirençli gen kümesinin bulunduğu kromozomal bölge ıslah programında önemli avantajlar sağlamaktadır.

Bu gen bloğu, geri melezleme vasıtasıyla uygun bir yere transfer edilebilir ve belirlenmiş özellikler (hastalık gibi) markırlar kullanılarak seçilebilir.

Çalışmada 10 primer (markır) 49 örnek üzerinde ayrı ayrı olarak ve herbir reaksiyon en az iki kez tekrar edilerek denendi ve amplifikasyon sonuçları değerlendirildi.

Antraknoza dayanıklılık genine bağlı olduğu bilinen UBC733 adlı RAPD markırı kullanarak test ettiğimiz 49 hat ve çeşitten; 29 tanesi dayanıklı ebeveyn, 20 tanesi hassas ebeveyn genotipini vermiştir (Tablo 4.1, 4.2). Bu hatlardan 29'u dayanıklı, 20'si hassastır. Bu nedenle UBC733 harita populasyonunun dayanıklı ebeveyni ile hassas ebeveynini 850 bp'lik bant farkı ile ayırır (Şekil 4.1).

UBC181 RAPD markırı kullanarak test ettiğimiz 49 hat ve çeşitten; 45 tanesi dayanıklı ebeveyn 4 tanesi hassas ebeveyn genotipini vermiştir (Tablo 4.1, 4.2). Bu hatlardan 45'i dayanıklı 4'ü hassastır. UBC181 harita populasyonunun dayanıklı ebeveyni ile hassas ebeveynini 1850 bp'lik bant farkı ile ayıramaz.

UBC681 RAPD markırı kullanarak test ettiğimiz 49 hat ve çeşitten; 41 tanesi dayanıklı ebeveyn, 8 tanesi hassas ebeveyn genotipini vermiştir (Tablo 4.1, 4.2). Bu hatlardan 41'i dayanıklı, 8'i hassastır. Bu nedenle UBC681 harita populasyonunun dayanıklı ebeveyni ile hassas ebeveynini 1750 bp'lik bant farkı ile ayırmaz (Şekil 4.2, 4.3).

UBC836 adlı ISSR markırı kullanarak test ettiğimiz 49 hat ve çeşitten; 44 tanesi dayanıklı ebeveyn, 5 tanesi hassas ebeveyn genotipini vermiştir (Tablo 4.1, 4.2). Bu hatlardan 44'ü dayanıklı, 5'i hassastır. Bu sebepten dolayı UBC836 markırı, harita populasyonunun dayanıklı ebeveyni ile hassas ebeveynini 700 bp'lik bant farkı ile ayırmaz (Şekil 4.4).

UBC858 adlı ISSR markırı kullanarak test ettiğimiz 49 hat ve çeşitten; 45 tanesi dayanıklı ebeveyn, 4 tanesi hassas ebeveyn genotipini vermiştir (Tablo 4.1, 4.2). Bu hatlardan 45'i dayanıklı, 4'ü hassastır. Bu nedenle UBC858 markırı, harita populasyonunun dayanıklı ebeveyni ile hassas ebeveynini 1400 bp'lik bant farkı ile ayırmaz.

Antraknoza dayanıklılık genine bağlı olduğu bilinen GA2 mikrosatellit markırı kullanarak test ettiğimiz 49 hat ve çeşitten; 23 tanesi dayanıklı, 26 tanesi hassas ebeveyn genotipini vermiştir (Tablo 4.1, 4.2). Bu hatlardan 23'ü dayanıklı, 26'sı hassastır. Bu nedenle GA2 adlı STMS markırı harita populasyonunun dayanıklı ebeveyni ile hassas ebeveynini 144 bp'lik bant farkı ile ayırmaz (Şekil 4.5).

TA2 adlı STMS markırı kullanarak test ettiğimiz 49 hat ve çeşitten; 30 tanesi dayanıklı, 19 tanesi hassas ebeveyn genotipini vermiştir (Tablo 4.1, 4.2). Bu hatlardan 30'u dayanıklı, 19'u hassastır. Bu nedenle TA2 denilen STMS markırı harita populasyonunun dayanıklı ebeveyni ile hassas ebeveynini 175 bp'lik bant farkı ile ayırır (Şekil 4.6).

TA72 ve TA146 adlı STMS markırlarını kullanarak test ettiğimiz 49 hat ve çeşitten; her iki markır içinde 22 tanesi dayanıklı ebeveyn, 27 tanesi hassas ebeveyn genotipini vermiştir (Tablo 4.1, 4.2). Bu hatlardan 22'si dayanıklı 27'si hassastır. Bu nedenle harita populasyonunun dayanıklı ebeveyni ile hassas ebeveynini TA72, 256 bp'lik bant farkı ile TA146 ise, 161 bp'lik bant farkı ile ayırmaz.

Antraknoza dayanıklılık genine bağlı olduğu bilinen TS54 adlı STMS markırı kullanarak test ettiğimiz 49 hat ve çeşitten; 20 tanesi dayanıklı ebeveyn, 29 tanesi hassas ebeveyn genotipini vermiştir (Tablo 4.1, 4.2). Bu hatlardan 20'si dayanıklı, 29'u hassastır. Bu nedenle harita populasyonunun dayanıklı ebeveyni ile hassas ebeveynini TS54 STMS markırı, 209 bp'lik bant farkı ile ayıramaz (Şekil 4.7, 8, 9).

AKN 395	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S
AKN 411	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R
AKN 426	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
AKN 568	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S
87AK71114	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R
Hassas Islah											
Hatları											
AKN 26	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S
AKN 63	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R
AKN 78	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S
AKN 79	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S
AKN 88	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AKN 89	S	S	R	R	R	R	S	S	R	S	S
AKN 564	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R
AKN 566	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R
AKN 567	S	S	R	R	R	S	R	S	S	R	S
AKN 570	S	S	R	R	S	R	R	S	R	R	S
AKN 587	S	S	R	R	R	S	R	R	S	S	R
AKN 589	S	S	R	R	S	R	S	S	S	R	S
AKN 591	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R
AKN 592	S	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R
AKN 599	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R
ESKVD 17	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S
ESKVD 18	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	R
ESKVD 45	S	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R
Harita											
Populasyonu											
Ebeveyn											
Hatları											
PI 599072	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
FLIP 84-92C(3)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

R: Resistant (Dirençli)

S: Susceptible (Hassas)

Tablo 4.2. *Ascochyta blight*'a hassas ve dirençli olan nohut genotiplerinde dirençlilikle ilgili olan markırların (RAPD, ISSR, ve STMS) test sonuçları

Primer Adı	Fragment Büyüklüğü (bp)	SNG	RNG	Ebeveyn Hatlarının Sayısı and Band Profili			
				RP	SP	RNG ⁺	SNG-
UBC733*	850	20	27	1	1	28	19
UBC181	1850	20	27	1	1	44	3
UBC681	1750	20	27	1	1	40	7
UBC836	700	20	27	1	1	43	4
UBC858	1400	20	27	1	1	44	3
GA2	144	20	27	1	1	22	25
TA2*	175	20	27	1	1	29	18
TA72	256	20	27	1	1	21	26
TA146	161	20	27	1	1	21	26
TS54	209	20	27	1	1	19	28

RP: Kontrol için dirençli (resistant) ebeveyn (parent)

SP: Kontrol için hassas (susceptible) ebeveyn (parent)

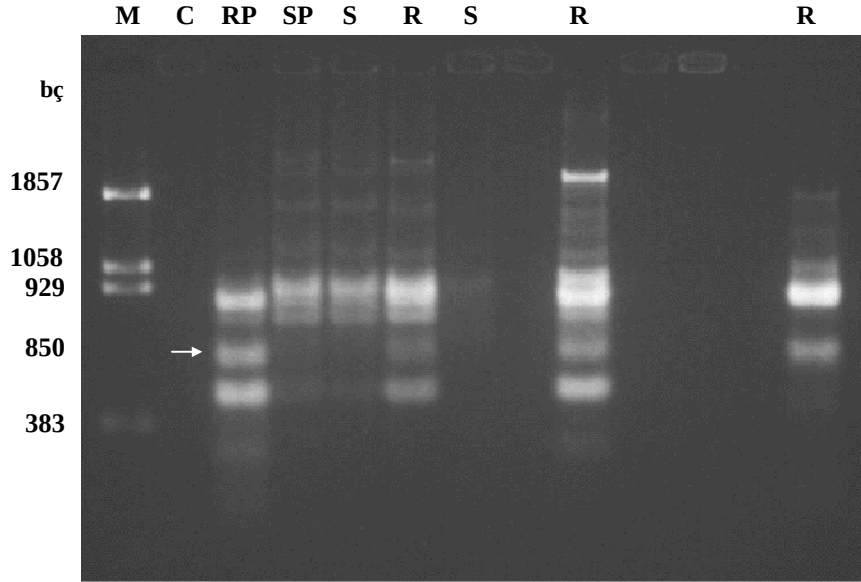
RNG: Dirençli (resistant) Nohut Genotipi

SNG: Hassas (susceptible) Nohut Genotipi

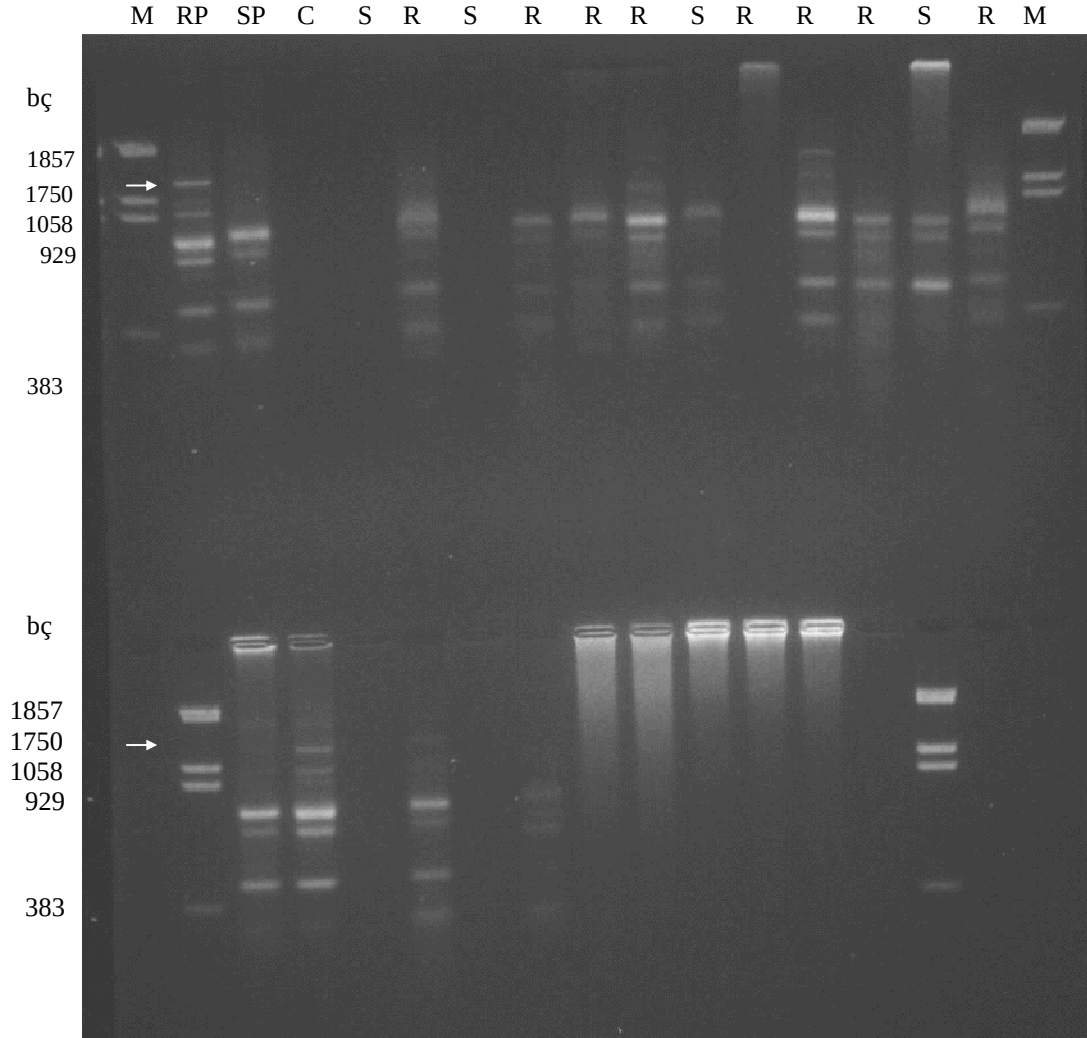
+ : Çoğaltılmış ürünün varlığı

- : Çoğaltılmış ürünün yokluğu

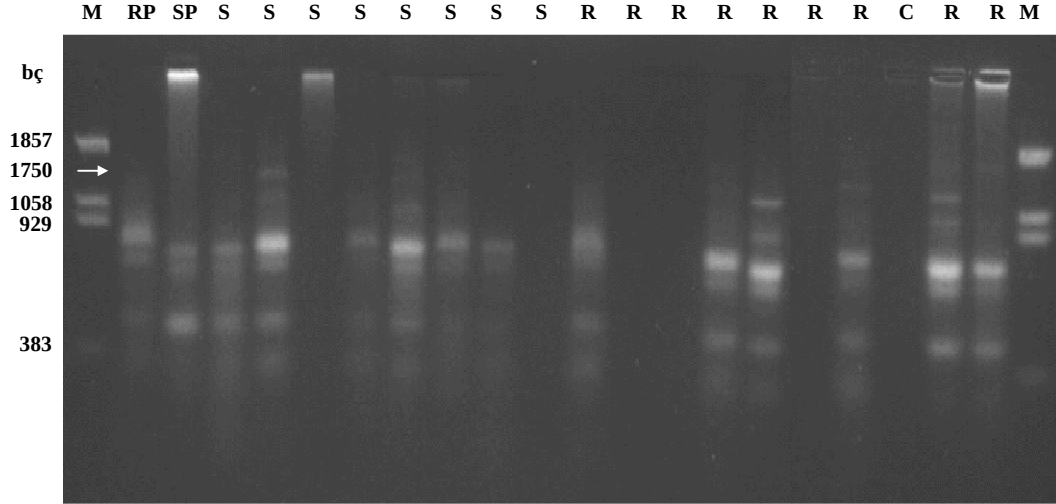
* : Markır yardımcı seçim için uygun markır



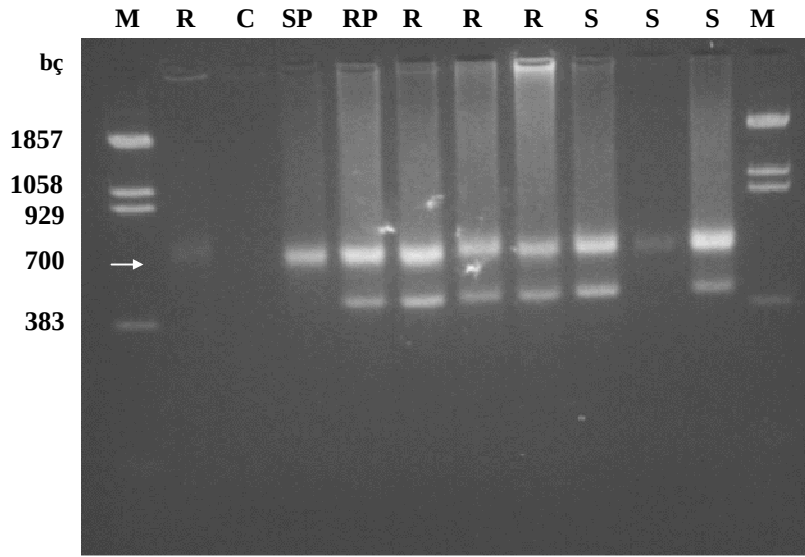
Şekil 4.1. UBC733 primeri kullanılarak nohut genotiplerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri. M. Markır, C. Kontrol, R: Antraknoza dirençli nohut genotipi, S: Antraknoza hassas nohut genotipi, RP: Antraknoza dirençli ebeveyn hattı [FLIP 84-92C (3)], SP: Antraknoza hassas ebeveyn hattı (PI 599072).



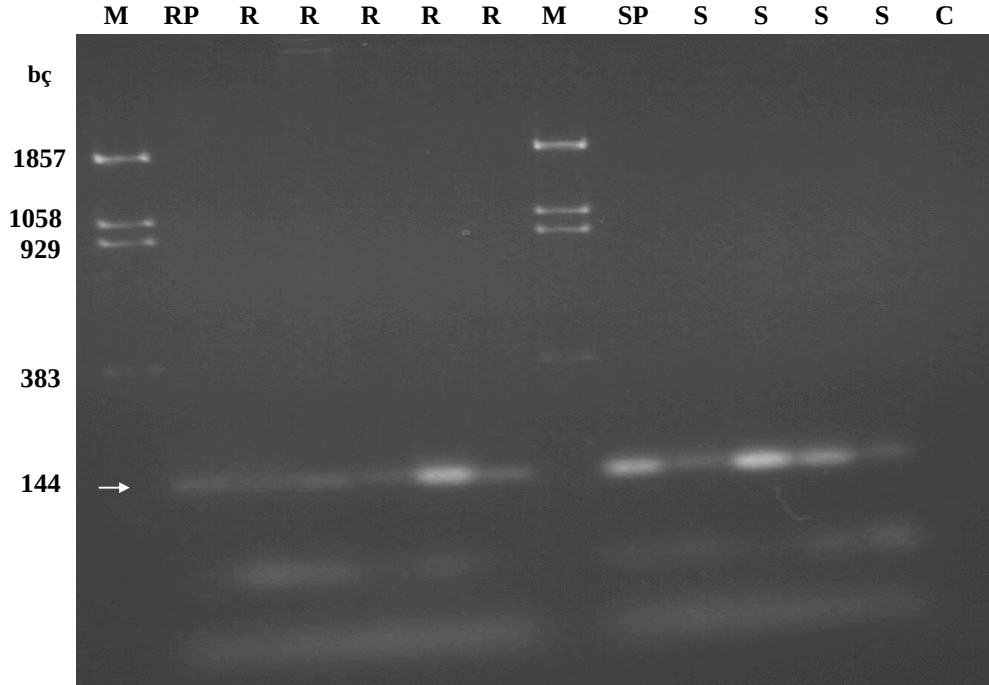
Şekil 4.2. UBC681 primeri kullanılarak nohut genotiplerinden DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri. M. Markır, C. Kontrol, R: Antraknoza dirençli nohut genotipi, S: Antraknoza hassas nohut genotipi, RP: Antraknoza dirençli ebeveyn hattı [FLIP 84-92C (3)], SP: Antraknoza hassas ebeveyn hattı (PI 599072).



Şekil 4.3. UBC681 primeri kullanılarak nohut genotiplerinden DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izlerinin %2'lik agaroz jelde gözlenmesi. M. Markır, C. Kontrol, R: Antraknoza dirençli nohut genotipi, S: Antraknoza hassas nohut genotipi, RP: Antraknoza dirençli ebeveyn hattı [FLIP 84-92C (3)], SP: Antraknoza hassas ebeveyn hattı (PI 599072).

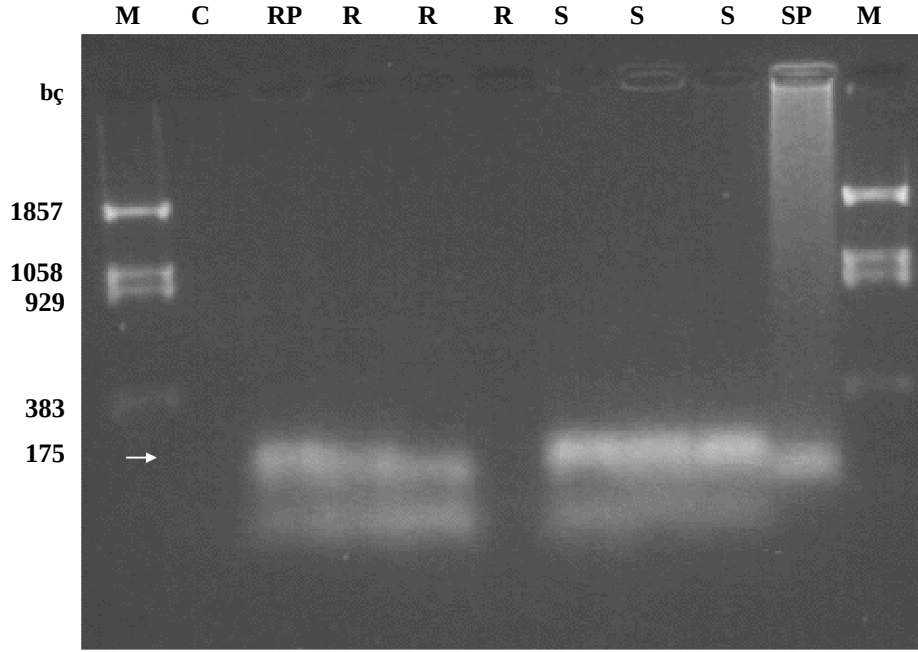


Şekil 4.4. UBC836 (ISSR) primeri ile çoğaltılmış nohut genotiplerinin %2'lik agaroz jelde gözlenen genomik parmak izleri. M. Markır, C. Kontrol, R: Antraknoza dirençli nohut genotipi, S: Antraknoza hassas nohut genotipi, RP. Antraknoza dirençli ebeveyn hattı [FLIP84-92C (3)], SP. Antraknoza hassas ebeveyn hattı (PI 599072).

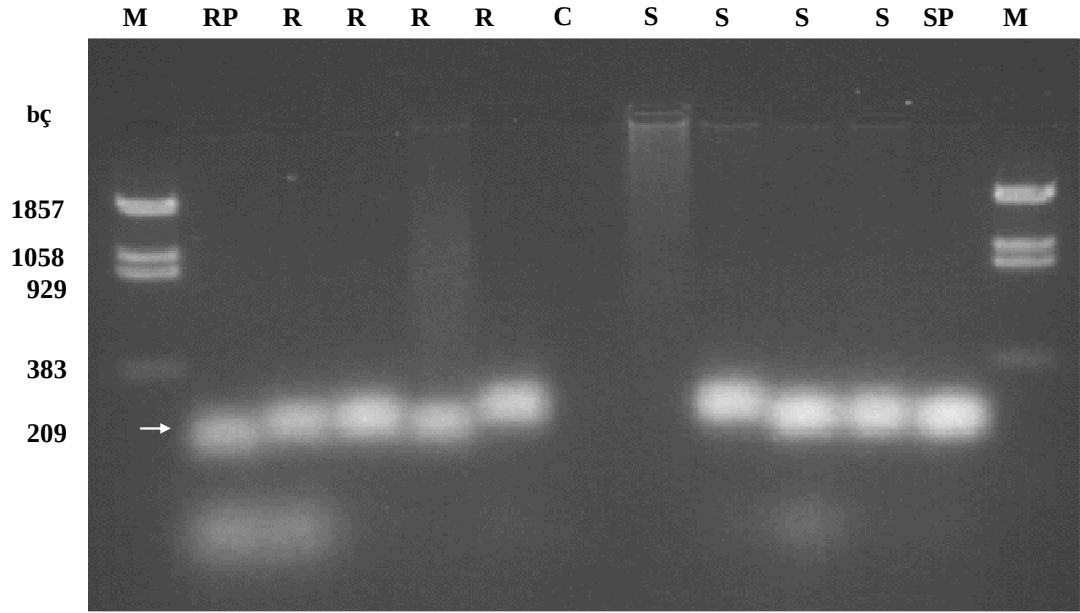


Şekil 4.5. GA2 (STMS) primeri kullanılarak nohut genotipine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu oluşan ürünlerin %2'lik agaroz jelde gözlenen genomik parmak izi profili.

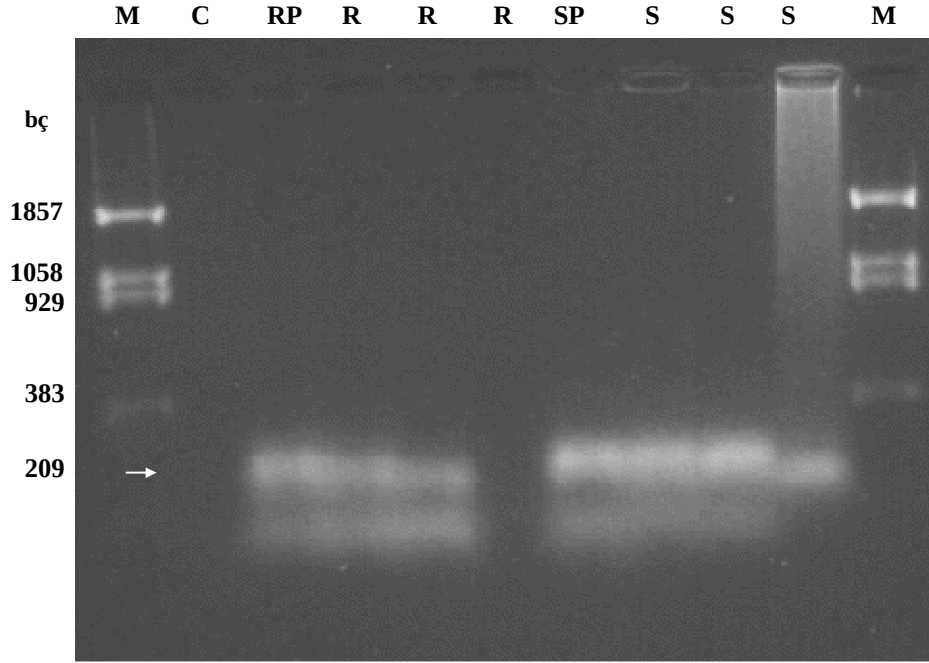
M. Markır, C. Kontrol, R: Antraknoza dirençli nohut genotipi, S: Antraknoza hassas nohut genotipi, RP: Antraknoza dirençli ebeveyn hattı [FLIP 84-92C (3)], SP: Antraknoza hassas ebeveyn hattı (PI 599072).



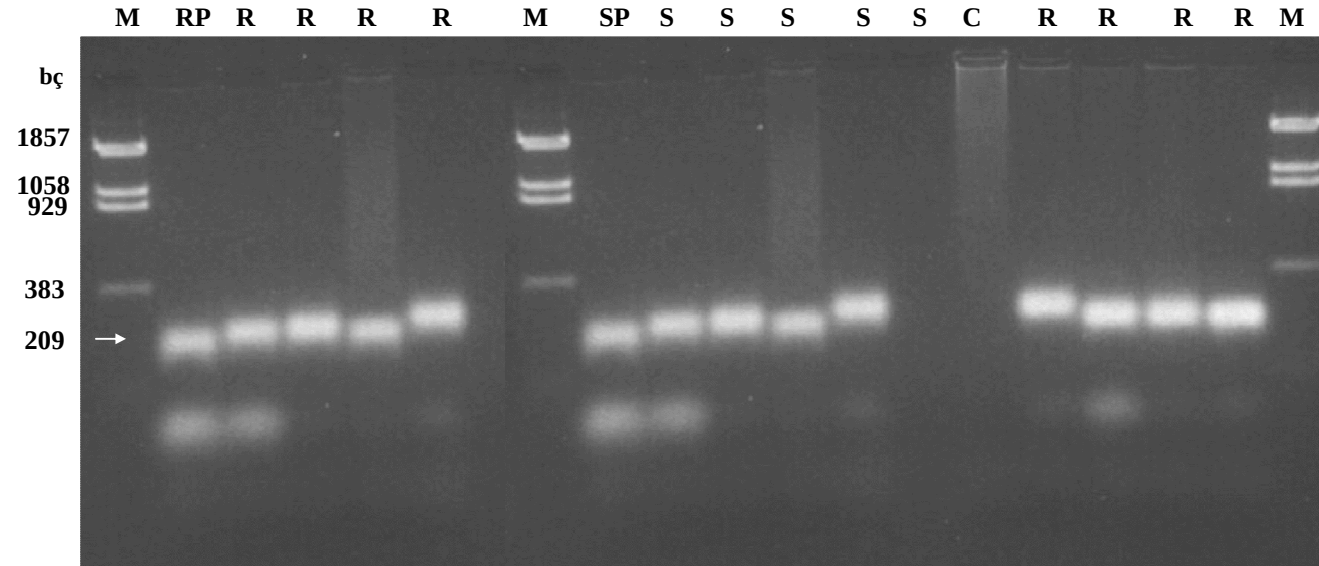
Şekil 4.6. TA2 (STMS) primeri kullanılarak nohut genotiplerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri. M. Markır, C. Kontrol, R: Antraknoza dirençli nohut genotipi, S: Antraknoza hassas nohut genotipi, RP: Antraknoza dirençli ebeveyn hattı [FLIP 84-92C (3)], SP: Antraknoza hassas ebeveyn hattı (PI 599072).



Şekil 4.7. TS54 primeri kullanılarak nohut ailesine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen STMS bant profili. M. Markır, C. Kontrol, R: Antraknoza dirençli nohut genotipi, S: Antraknoza hassas nohut genotipi, RP: Antraknoza dirençli ebeveyn hattı [FLIP 84-92C (3)], SP: Antraknoza hassas ebeveyn hattı (PI 599072).



Şekil 4.8. TS54 primeri kullanılarak nohut bireylerine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen ve %2'lik agaroz jelde gözlenen STMS genomik parmak izi (bant profili). M. Markır, C. Kontrol, R: Antraknoza dirençli nohut genotipi, S: Antraknoza hassas nohut genotipi, RP: Antraknoza dirençli ebeveyn hattı [FLIP 84-92C (3)], SP: Antraknoza hassas ebeveyn hattı (PI 599072).



Şekil 4.9. TS54 primeri kullanılarak nohut ailesine ait DNA'nın çoğaltımı sonucu elde edilen STMS bant profili. M. Markır, C. Kontrol, R: Antraknoza dirençli nohut genotipi, S: Antraknoza hassas nohut genotipi, RP: Antraknoza dirençli ebeveyn hattı [FLIP 84-92C (3)], Antraknoza hassas ebeveyn hattı (PI 599072).

5. TARTIŞMALAR

5.1. DNA İZOLASYON YÖNTEMİNİN BELİRLENMESİ

DNA izolasyon yöntemi, Doyle and Doyle tarafından (1987) önerilen miniprep tekniği ve mikroprep tekniği kullanılarak yapılmıştır. İzole edilen genomik DNA (Mayer et. al.,1997)'nin ve (Sambrook et al., 1989) tanımladığı protokol takip edilerek polimeraz zincir reaksiyonu için kullanıldı.

5.2. UYGUN GENETİK MARKIRIN SEÇİLMESİ

Birbiriyle sıkı ilişkili baklagillerin belirlenmesi, filogenetik durumlarının tayin edilmesi ve genetik bağlantı haritalarının veya DNA dizisinin belirlenmesi, yeni germplazmaların elde edilmesi, hızlı ve güvenilir bir şekilde elde edilebilen pek çok polimorfik karakterleri gerektirir. Moleküler polimorfik DNA markırları genetik bağlantı haritalarında etkin bir şekilde kullanılmıştır (Lin et. al., 1996). Bununla beraber bitki yetiştiriciliğinde DNA markır sisteminin seçimi, proje konusuna, popülasyonun özelliğine, araştırılan türlerin genetik çeşitliliğine, markır sisteminin yeteneğine, analiz için gerekli olan zamana ve maddi gereksinime bağlıdır. Aslında herbir markır sisteminin üstün olduğu ve zayıf olduğu özellikleri vardır. Bu yüzden de her bir markır sisteminin yararlılığını kullanmadan belirlemek zordur.

Moleküler markırlar, bitki genetiğinde gen haritalama ve markır yardımcı seçim için kullanılmaktadır. Ayrıca moleküler markırlar kullanılarak genetik özelliklerin diğer türlere aktarılması amacı ile moleküler temelli genlerin etiketlenmesi ve özel lokusların tanımlanması son derece önemlidir. Bunun için nohut genom haritası 2000 yılında tanımlanmış ve haritada direnç geni ile ilgili QTL belirlenmiştir. Fakat dirençlilikle ilişkili olup olmadığı bilinmemektedir. Kantitatif özellikleri içeren QTL'de *Ascochyta blight*'a dirençle ilgili markırlar (RAPD, ISSR ve STMS) dir (Tekeoğlu et. al., 2000).

Bizim çalışmamızda kullandığımız markırlar bu nedenle son derece önemlidir. Çünkü deney sonuçlarına göre 10 primerden 2'si (UBC733 ve TA2) dirence özgü markırlar olarak saptanmıştır. Bunlar direnç genini etiketlemek (lokus tayini yapmak) ve gen izolasyonu için kullanılır. Deney sonuçlarına göre dirence özgü olmayan markırda ise, amplifikasyon reaksiyonlarının elektroforez analizi sonucunda hassas olan genotiplerde ürün vermediği (bant gözlenmediği) görüldü. Bunun nedeni bu primerin kalıp DNA'da (cDNA) tamamlayıcısı oldukları bölgenin bulunmamasıdır.

RAPD markırlar dominanttır. Aynı uzunluğa sahip olan DNA segmentleri gibi RAPD markırları tanımlamak zordur. Fakat, bu markırlar genotiplerin genomik haritalarının çıkarılması için uygundur. Bitki ve hayvan ıslah çalışmalarında, populasyon genetiği çalışmalarında DNA parmakizinin çıkarılmasında, genotipler arasında polimorfizmin tayin edilmesinde en etkili ve hızlı bir metoddur. RAPD markır içeren genetik haritalar, markır yoğunluğundan dolayı RFLP veya PCR'a dayalı diğer metodlara göre daha etkilidir. Hem RAPD hem de STMS markırların kullanılması nohut genotiplerinde daha etkilidir. RAPD ve STMS markırları, nohut yetiştirilen alanlarda antraknoza sürekli direnç gösteren nohut kültürlerinin geliştirilmesi, seçilmesi ve ıslah edilmesi için son derece önemlidir. Bununla beraber RAPD'in tüm bu üstünlüklerinin yanında karşılaşılan bazı problemler de vardır. Bunların başında dominant allelik ekspresyon ve bununla ilişkili olarak lokus başına iki allel olduğunun varsayılması gelir. Bu durumda alternatif bir yöntem RAPD parçalarının restriksiyon endonükleazları ile muamele edilmesi ve çeşitliliğin araştırılmasıdır, bu yolla heterozigotlar belirlenebilir.

Bu yöntemin güvenilirliğinin artırılabilmesi için elektronik pipet kullanımı önemle tavsiye edilmektedir. DNA'nın hava ile teması mümkün olduğunca engellenmelidir. Primerlerin uygun bir şekilde stok ve çalışma preparatları hazırlanarak -20 °C'de muhafaza edilmelidir. Bu yöntemlerin uygulanması, tekrarlanabilir ve kaliteli sonuçlar verecektir (Fritsch and Reiseberg, 1996).

Oldukça basit bir genoma sahip, diploid bir organizma olan nohut (*C. arietinum* L.) ailesine ait döl analizlerinin çıkarılması ve antraknoza hassas ve dirençli genotipler arasındaki genetik polimorfizmlerin belirlenerek nohut genom haritasında önceden tesbit edilen ve antraknoza direnç geni ile ilişkili olan moleküler markırların dirençliliğe özgü markırlar olup olmadığının test edilmesi ve Türkiye nohut genotiplerinde bu markırların varlığının ıspatlanması amacıyla yapılan bu çalışma, zaman ve maliyet açısından elverişli olması, çok küçük miktarlardaki DNA ile analizlerin yapılması açısından da önemlidir.

Antraknoza hassas ve dirençli genotiplerin bu markırlarla yapılan polimorfizm analizi sonuçları ve markırların dirençliliğe özgüllüğünün tanımlanmasının sağlanarak hastalığa dirençli genin izolasyonuna basamak teşkil ederek markır yardımcı seçimde yani invitro koşullarda materyalin herhangi bir patojenle enfekte edilmesine gerek kalmaksızın dirençliliğin tarla şartlarında uzak olarak en kısa zamanda ve sağlıklı olarak test edilerek tohumluk üretim programlarını kombine edip gen bankalarının oluşturulmasının amaçlandığı bu çalışmada özel bir donanım veya ön deneylere ihtiyaç duymayan ve oldukça basit olan agaroz jel elektroforezi kullanılarak başarılı sonuçlar elde edildi.

5.3. RAPD, ISSR VE STMS MARKIR SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

UBC733 RAPD markırı harita popülasyonunun dayanıklı ebeveyni ile hassas ebeveynini 850 bp'lik bant farkı ile ayırır. Aynı şekilde TA2 STMS markırı harita popülasyonunun dayanıklı ebeveyni ile hassas ebeveynini 175 bp'lik bant farkı ile ayırır. Bu nedenle UBC733 ve TA2 markırları kullandığımız 2 ebeveyn hattı ve onların döllerini dışındaki genotiplerde de aynı ayırıcı reaksiyonu gösterdiği için hassas ve dayanıklı nohut genotiplerinin seleksiyonunda kullanılması uygun görülmüştür.

Bu markırlar dayanıklılığa cevap verdiği için invitro şartlarda dayanıklı ve hassas olan genotipin test edilip seçiminde faydalı olacaktır. Böylece tarlada dayanıklı olan tipleri invitro şartlarda elimizdeki DNA markırlarını kullanarak tarladaki dayanıklılığın laboratuvar koşullarında da kanıtlanması sağlanacaktır. Böylece nohutta antraknoza dayanıklı çeşit geliştirme de zaman kazanmak ve mevcut dayanıklılığı istenen genotiplere etkin şekilde aktarmak araştırmanın sonuçları olacaktır. Çalışmadan çıkarılan sonuçlara göre; RAPD teknolojisi, antraknoza dirençli nohut geliştirmek ve nohut ıslahı programlarında faydalı olmaktadır. Ayrıca moleküler markırlar birden fazla geni istenen bir genotipte toplamak için yapılacak gen piramidi oluştururken de kullanılır. RAPD ve STMS markırları, nohut germplazmında ve *Ascochyta blight*'a dirençli ıslah materyallerinin seçiminde kolaylık sağlar.

Bizim kullandığımız markırlar sayesinde nohut üreticileri ya da ıslahçılar hastalığa dirençli olan bölgenin seçimini güven altına almış olurlar. Bu nedenle mevcut markırlar tohum germinasyonu öncelikli olarak foliar enfeksiyona direnci ortaya çıkarmak için potansiyel oluşturur. Çünkü tarla da aynı özellikleri gösteren nohutları gerek morfolojik gerekse filogenetik açıdan ayırmak çok zordur. Bu markırlar, gelecekte ıslah programlarında markır yardımcı seçim vasıtasıyla dirençli germplazmların ayrımı için faydalı olacaktır. Böylece direnç geninin klonlanmasına, gen haritasının çıkarılmasına da bir basamak olarak tercih edilecektir. Ayrıca çalışma sonuçlarına göre; RAPD markırlarla çalışmak ve analiz yapmanın STMS markırları ile çalışmaktan daha kolay, ekonomik ve tercih edilebilir olduğu kanıtlanmıştır. Nohutta *Ascochyta blight*'a direnç geni ile direkt ilişkili olarak UBC733 RAPD markır ile TA2 adlı STMS markırı dirençliliğe özgü markırlar olarak bulunmuştur. Bu markırlar marker-assisted selection (MAS) amacıyla kullanılabilir. Markır vasıtasıyla antraknoza dirençli ve hassas olan fenotipi tanımlamak için materyali inoküle etmeye gerek kalmaksızın seçim kolaylığı sağlanır. Eğer dirençli olan germplazmda bant gözlenmiyorsa primer direnç geni ile doğrudan ilişkili olmadığı için MAS'de kullanılamaz. Elde edilen sonuçlarda da diğer 8 markır dirençliliğe özgü markır olmadığı için dirençlilik tayininde kullanılmayacaktır. Türkiye nohut genotiplerinde bu markırların varlığının gösterilmesi bundan sonraki ıslah çalışmalarında dayanıklılık genlerinin takibini ve istenen genotiplere aktarılmasını kolaylaştıracaktır. Antraknoza dayanıklılığı kontrol eden genlerin nohut genom

haritasında yerlerinin belirlenmesi, genlerin izolasyonu için gerekli ilk aşamanın aşılması anlamına gelmektedir. Ayrıca moleküler markırlar birden fazla geni istenen bir genotipte toplamak için yapılacak gen piramidi oluşturulurken de kullanılırlar.

Bu çalışmalar ıslahçılara dayanıklı çeşit geliştirmek ve bitkide patojene özgü direnç karakterinin belirlenmesinde patoloğlara yardımcı olmaktadır.

Yapılan çalışmada antraknoza dirençli ve hassas genotiplerdeki bireyleri içeren nohut ailesinin (*C. arietinum* L.) RAPD, ISSR ve STMS markırları ile döl analizlerinin çıkarılması ve antraknoz hastalığına karşı dirençli ve hassas nohut genotiplerinin nohut genom haritasına bağlı olarak bu markırlarla ilişkisinin tanımlanarak genotipler arasındaki genetik polimorfizmlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla uzunlukları 10 veya daha fazla baz arasında değişen ve antraknoza direnç geni ile ilişkili olduğu belirlenmiş olan 10 farklı oligonükleotid primer kullanılmıştır. Çünkü bu primerlerin antraknoza dirençliliği tayin etmede direkt etkili olup olmadığını test ederek markır yardımcı seçimde kullanılabileceğini belirterek, bu markırların dirençli gen izolasyonunda faydalı olabileceğini kanıtlamak amaçlanmıştır. Ancak kullanılan bu 10 primerin 8 tanesi ile (UBC181, UBC681, UBC836, UBC858, TA72, TS54, GA2, TA146) yapılan amplifikasyon reaksiyonlarının, elektroforez analizi sonucunda dirençli genotiplerle dirençli ebeveyn hatlarının aynı özelliği taşıyan ve dirençliliğe özgü polimorfik bantlar oluşturmadığı gözlemlendi. Bunun sebebinin, nükleotid dizisi rastgele seçilmiş olan bu primerlerin kalıp DNA'da tamamlayıcısı oldukları herhangi bir bölgenin bulunmamasından veya dirençli gen ile aynı lokusta olmamasından kaynaklanmaktadır. Fakat diğer 2 (UBC733, TA2) primer dirençliliğe özgü primer olarak tanımlanmıştır. Çünkü antraknoza dirençli olan ebeveyn hatları ile dirençli nohut genotipleri aynı bant profili gösterirken, hassas ebeveyn hatları ile hassas nohut genotipleri de aynı bant profilini göstermişleridir. Dirençli çeşit ve hatlar kendi arasında, hassas çeşit ve hatlarda kendi içlerinde homomorfik bantlar oluşturmuşlardır. Yüksek oranda homomorfik bantlar bireylerin birbirlerine fenotipik ve genotipik karakterler bakımından benzerliklerini, heteromorfik bantlar ise bireyler arasındaki polimorfizmleri tayin etmede kullanılabilmektedir.

Amplifikasyon ürünü veren 2 primerin ortaya koyduğu bantlar incelenirken özellikle dirençlilikle ilgili olabilecek bantların varlığı araştırıldı. Bu araştırma sırasında aranılan özellik; sadece antraknoza dirençli ebeveyn olan FLIP 84-92C(3) de ve antraknoza dirençli nohut genotiplerinde gözlenen ya da bunun tam tersi olarak sadece antraknoza hassas ebeveyn hattı olan PI 599072 de ve antraknoza hassas nohut genotiplerinde gözlenen bir bantın bulunmasıydı. Çünkü, dirençli özellik gösteren bireylerde böyle bir bantın varlığı, bu bantın nohut antraknoz hastalığına karşı direncin sağlanması ile ilgili olabileceğinin, hassas özellik gösteren bireylerde böyle bir bantın varlığı ise bu bantın antraknoza hassasiyete sebep olabileceğinin bir göstergesi olabilir. Yaptığımız çalışmada bu tarife uygun olan iki farklı markır bulundu. Bunlardan birisi UBC733 denilen 850 baz çifti (bç) uzunluğunda olan RAPD markır (GGGAAGGGAG) 10 bazdan ibarettir. Diğeri ise, 175 baz çifti uzunluğunda TA2 denilen ve 10 bazdan fazla olan STMS markırıdır. Antraknoza dirençli nohut genotiplerinde ve dirençli ebeveyn hatlarında bulunan fakat, antraknoza hassas bireylerin hiçbirinde bulunmayan, STMS için ise dirençli ebeveynlerle dirençli genotipler aynı lokusta, hassas olanlarda hassas bireylerle aynı bant hizasında dizilim gösterdikleri için bu markırların dirençlilikle ilgili olduğu düşünülmektedir.

Yapılan amplifikasyonlar sonucunda elde edilen ve dirençlilikle ilgili olabileceği düşünülen markırların dışında diğeri markırlar bazı bireylerde “non-parental” bantlar meydana getirirler bu bantların sebebi yeni bağlanma bölgelerinin oluşması, mutasyon sonucunda meydana gelen nükleotid dizisi değişimleri veya RAPD, ISSR ve STMS’in doğasından kaynaklanan hatalar olabilir. Moleküler biyoloji alanındaki son gelişmelerle dirençli geni etiketleme ve haritalama çalışmaları hız kazanmıştır. Markır yardımı seçimin önemi çok sayıda ürün üzerinde gösterilmiştir. Özellikle ekonomik olarak önemli karakterler için markırların kullanılması ilk olarak fasulyede tanımlanmıştır. Ayrıca soğuk mevsimlerde yetişen baklagillerin genetik bağlantı haritalarının oluşması, genlerin haritalanması ve antraknoz gibi biyotik stres faktörlerine karşı direncin tanımlanarak direnç geninin moleküler markırlarla etiketlenerek gen izolasyonunun sağlanması ileride yapılacak hedefler olarak saptanmaktadır.

Bizim kullandığımız markırlar, harita populasyonunda antraknoza dirençli gene en yakın ve gen ile ilişkili olan markırlardır. Nohutta çok sayıda morfolojik mutantlar tanımlanmıştır (Muehlbauer and Singh, 1997). Fakat onların markır olarak kullanım alanları çok sınırlıdır. Ticari önemi olan bitkilerden fasulye (*Pea*)ve bakla da (*Faba bean*) önemli karakterlerin etiketlenmesinde markırlar kullanılmıştır.

6. SONUÇLAR

Ascochyta blight (Nohut antraknozu) denilen hastalığa karşı hassas ve dirençli olan 47 nohut genotipi ile harita populasyonunun hassas ve dirençli 2 ebeveyni ile birlikte 49 nohut genotipinin genç yapraklarından genomik DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen DNA'larda yapılan spektrofotometrik ölçümler ve kalite jeli uygulamaları sonucunda hem saflık oranı hem de miktar yönünden PCR'a dayalı tekniklerden olan RAPD; ISSR ve STMS analizleri için uygun olduğu saptandı.

Çalışmamızda, nohut genom haritasında antraknoza direnç genine bağlı olduğu belirtilen 3 RAPD, 2 ISSR ve 5 STMS markırı olmak üzere 10 farklı markır kullanıldı. Herbir genotip için uygulanan RAPD, ISSR ve STMS yöntemleri ile mevcut bireylere ait DNA parmakizleri çıkarıldı. Elde edilen markır sonuçları kullanılarak genotipler arasındaki genetik polimorfizm tesbit edildi. Buna göre, antraknoza dayanıklılık genine bağlı olduğu bilinen UBC733 adlı RAPD markırı, harita populasyonunun dayanıklı ebeveyni ile hassas ebeveynini 850 bp'lik bant farkı ile ayırır. Ayrıca, UBC733 markırı bu iki ebeveyn PI 599072 (hassas) FLIP 84-92C(3) (dirençli) ve onların dölleri dışındaki genotiplerde de aynı ayırıcı reaksiyonu göstermiştir. Böylece bu markırın hassas ve dayanıklı genotiplerin seleksiyonunda kullanılması uygun görülmüştür. Çünkü bu markır dirence özgü lokus spesifik bantlar oluşturduğu için dirençlilerde görülen bantlar hassas olan bireylerde gözlenmemiştir.

TA2 STMS markırında, dayanıklı ebeveyn ile hassas ebeveynini 175 bp'lik bant farkı ile ayırmaktadır. Çünkü, dirençli ebeveyn ve dirençli nohut genotipleri hizasında görülen bant ile hassas ebeveyn ve hassas nohut genotipleri hizasında görülen bant profilleri farklıdır. Dirençli olan genotiplerde aynı hizada homomorfik bantlar ve hassas olan genotiplerde de kendi içlerinde aynı hizada bant profili (polimorfik olmayan bantlar) elde edildi.

Çalışmada kullanılan 10 farklı primerden sadece 2 tanesinin (UBC733 ve TA2) markır yardımcı seçimde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Türkiye nohut genotiplerinde bu markırların varlığının gösterilmesi ve nohut genom haritasında bu iki markırın antraknoza direnç genine bağlı olabileceği veya genin içinde bulunabileceği sonucunun elde edilmesiyle bundan sonraki ıslah çalışmalarında dayanıklılık genlerinin takibi ve istenilen genotiplere aktarımı kolaylaşmış olacaktır. Antraknoza dayanıklılığı kontrol eden genlerin nohut genom haritası üzerinde yerlerinin moleküler markırlarla belirlenmesi genlerin izolasyonu için gerekli ilk aşamanın geçilmesi anlamına gelmektedir.

Nohutta antraknoza dayanıklı çeşit geliştirmede zaman kazanmak ve mevcut dayanıklılığı istenen genotiplere daha etkin şekilde aktarmak araştırmanın ilk sonuçları olacaktır. Bu konuda potansiyel yararlanıcılar nohut ıslahçıları, dayanıklılık ıslahı araştırmacıları ve akademik çalışma çevreleri olacaktır. Bu çalışmalar, ıslahçılara dayanıklı çeşit geliştirmede yardımcı olmaktadır. Ayrıca, moleküler markırlar birden fazla geni istenen bir genotipte toplamak için yapılacak gen piramidi oluşturulmasında ve agronomik öneme sahip genlerin gen haritalarına bağlı olarak izole edilmesinde, böyle izole edilen genlerin izole edildikleri tür dışında diğer organizmalara da aktarılmasında kullanılırlar.

Markır yardımcı seçim vasıtasıyla nohut hastalıklarının üstesinden gelmek mümkündür. Moleküler markırlar bitki genom analizi için önemli bilgiler sağlamaktadır. İlgili markır, direnç genini tanıır, ve aynı lokusta, lokus spesifik dominant fragmentler oluşturur, yani dirence özgü bantlar oluşur. PCR reaksiyonları, hastalığa dirençli olan gen ile ilişkili markırları tayin etmek için de kullanılmaktadır.

Kısaca özetlemek gerekirse; UBC733 ve TA2 markırları dirençli nohut genotiplerinde *Ascochyta blight*'a direnç ile ilişkili fragmentler oluştururken aynı markırlar hassas nohut genotiplerinde dirence özgü bandlar (fragmentler) oluşturmazlar. UBC733 adlı RAPD markır, antraknozun tayini içinde önemli bilgiler sağlar. Bu markır, *Ascochyta blight*'a direnç genine diğer RAPD markırlardan daha yakın olduğu için dirençli nohut bireylerinin seleksiyonuna yardımcı olmaktadır.

Bu markırlar, haritaya bağlı olarak dirençli genin klonlanması ve gelecekteki ıslah proğramlarında markır yardımcılı seçim sayesinde dirençli germplazmların ayrılmasında da etkili olarak kullanılacaktır. Çalışma bu bağlamda da bundan sonraki moleküler biyojik çalışmalara öncülük edecektir.

KAYNAKLAR

- AÇIKGÖZ, N., Experience on transfer of management of technology for Ascochyta blight of chickpea in Turkey, Anadolu Journal of AARI 1-8, 1997.
- AÇIKGÖZ, N., KARACA, M., ER, C., and MEYVECİ, K., Chickpea and lentil production in Turkey, Food Legumes, 388-398, 1994.
- AKKAYA, M.S., SHOEMAKER, R.C., SPECHT, J.E., BHAGWAT, A.A. and CREGAN, P.B., Integration of Simple Sequence Repeat DNA Markers into a Soybean linkage Map, Crop Sci. 35: 1439-1445, 1995.
- BANERJEE, H., PAI, R.A., and SHARMA, R.P., Restriction Fragment Length Polymorphism and Random Amplified Polymorphic DNA analysis of Chickpea accessions, Biologia Plantarum, 42 (2):197-208, 1999.
- BARRIER, M., FRIAR, E., ROBICHAUK, R. and PURUGGANAN, M., Interspecific Evolution in Plant Microsatellite Structure, Gene 241: 101-105, 2000.
- BUROW, M.D. and BLAKE, T.K., Molecular tools for the study of complex traits, CRC. press, LLC, 1998.
- CHOUMANE, W., WINTER, P., WEIGAND, F., and KAHL, G., Conservation and variability of Sequence-Tagged Microsatellite Sites (STMs) from Chickpea (*Cicer arietinum* L.) within the genus Cicer, Theor Appl Gen., 101:269-278, 2000.
- DEY, S.K. and SINGH, G., Resistance to Ascochyta blight in Chickpea Genetic Basis, Euphytica, 68: 147-153, 1993.

DİPAK, K.S., TEKEOĞLU, M., RATNAPARKHE, M.B., KAİSER, W.J., and MUEHLBAUER, F.J., Identification and mapping of QTLs conferring resistance to Ascochyta blight in Chickpea. *Crop Sci* 40. 1606-1612, 2000.

DOLAR F.S., Development of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr in the leaves of susceptible and resistant chickpea cultivars, *J. Türk Phytopat.*, 23: 27-35, 1994.

DOYLE, J.J., and DOYLE J.L., A RAPD DNA isolation procedure for small amount of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull.* 19: 11-15, 1987.

FARIS, J.D., W.L., LIU, CHEN, P.D. and GILL, B.S., Candidate Gene Analysis of Quantitative Disease Resistance in Wheat, *Theor Appl Genet* 98: 219-225, 1999.

FEYS, B.J. and PARKER, J.E., Interplay of signaling pathways in Plant disease resistance, *TIG*, 16: 449-455, 2000.

FOOD and AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO) , FAO Production year book. FAO, 1996.

FOOD and AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO) , FAO Production year book. FAO, 1998.

FOOLAD, M.R., ARULSEKAR, S. and RODRIGUEZ, R.L., Applications of Polymerase Chain Reaction (PCR) to Plant Genome Analysis, *Plant Cell Tissue and Organ Culture Fundamental Methods*, 1995.

FORD, L., KAEMMER, D., KAHL, G. and LAGODA, P.J.L., Molecular marker assisted analysis of the Musa Genome Complex, *Annual Report*, 24-28, 1996.

FORD, R., PANG, E.C.K. and TAYLOR, P.W.J., Genetics of Resistance to Ascochyta blight (*Ascochyta lentis*) of lentil and the identification of closely linked RAPD Markers, *Theor Appl Genet*, 98:93-98, 1999.

FRITISCH, P., and REISEBERG, L.H., The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in Conservation Genetics in: SMITH, T.B., WAYNE, R.K. (Ed.). *Molecular Genetic Approaches in Conservation* Oxford University, Press, 1996.

GARVÍN, D.F., and WEEDEN, N.F., Genetic Linkage Between Isozyme, Morphological, and DNA Markers in Tepary Bean, *The Journal of Heredity*, 85: 4, 1994.

GILBERT, J.E., LEWIS, R.V., WILKINSON, M.J. and CALIGARI, P.D.S., Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections, *Theor Appl Genet*, 98: 1125-1131, 1999.

HEATH, M.C., Evolution of Plant Resistance and Susceptibility to Fungal Invaders, *Canadian Journal of Plant Pathology* 9: 389-397, 1987.

HUNG, K.C., ZENG, Z.B., and TEASDELE R.D., Multiple Interval Mapping for Quantitative Trait Loci, *Genetics* 152, 1203-1216, 1999.

HÜTTEL, B., WINTER, P., WEISING K., CHOUMANE, W., WEIGAND, F., and KAHL, G., Sequence-Tagged Microsatellite Site Markers for Chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Genome* 42: 210-217, 1999.

ICARDA, Chickpea in the Nineties, 1997.

JOHNS, A.M., SKROCH, P.W., NIENHUIS, J., HINRICHSSEN P. and BASCUR, G., Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data, *Crop Science*, 37: 605-613, 1997.

JOHNSON, R., Classical plant breeding for durable resistance to diseases, *Journal of Plant Pathology*, 82, 2000.

KAHL, G., KAEMMER, D., WEISING, K., KOST, S., WEIGAND, F. and SAXENA, M.C., The Potential of Gene Technology and Genome Analysis for Cool season Food Legume Crops: Theory and Prac. *Euphy*. 73: 177-189, 1994.

KAISER, W.J. and CRUTE, I.R., Gene-for-Gene Recognition in Plant-Pathogen Interactions, *The Royal Society* 346: 345-349, 1994.

KAR, S., JOHNSON, T.M. NAYAK, P. and SEN, S.K., Efficient transgenic plant regeneration through *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum L.*), *Plant Cell Reports*, 32-37, 1996.

KARP, A., EDWARDS, K.J., BRUFORD, M. and WOSMAN, B, Molecular Technologies for Biodiversity evaluation: Opportunities and Challenges, *Nature Biotechnology*, 15, 1997.

KAUFMAN, B., RICHARDS, S. and DIERIG, D.A., DNA isolation method for high polysaccharide *Lesquerella* species, *Indust. Crops and Prod* (9), 111-114, 1999.

KAZAN, K., MUEHLBAUER, F.J., WEEDEN, N.F., and LADIZINSKY, G., Inheritance and Linkage Relationships of Morphological and Isozyme loci in Chickpea (*C. arietinum L.*), *Theor Appl Genet*, 86: 417-426, 1993.

LEE, Michael, DNA Markers and Plant Breeding Programs, Advances in Agronomy, V: 55, 1995.

LIN, J.H.Y., JHU, KUO, J., MA, JIN et al., Identification of molecular markers in Soybean comparing RFLP, RAPD, and AFLP DNA Mapping Techniques. Plant Molecular Biology Reporter. Vol: 14 (2), 156-169, 1996.

MALHOTRA, R.S., PUNDIR, R.P.S. and KAISER, W.J., Cicer Species – Conserved Resources, Priorities for Collection and Future Prospects, Academic Publishers, Netherlands, 603-611, 2000.

MALHOTRA, R.S, PUNDIR, R.P.S and SLINKARD, A.E., Chickpea, 1994.

MANIATIS, T., FRITSCH, E. F., and SAMBROOK, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour, New York, 1982.

MAYER, M.S., TULLU, A., SIMON, C.J., KUMAR, J., KAISER, W.J., KRAFT, J.M., and MUEHLBAUER, F.J., Development of a DNA marker for Fusarium wilt resistance in chickpea, Crop Science 37: 1625-1629, 1997.

MELCHINGER, A.E., Use of Molecular Markers in Breeding for Oligogenic Disease Resistance, Plant Breeding, Berlin, 1990.

MEYER, K., BENNING. G. and GRILL, E., Clonning of Plants genes based on genetic map location, Genome Mapping in Plants, Landes Company, 1996.

MHEARNE, C., GHOSH, S. and TODD, J.A., Microsatellites for Linkage Analysis of Genetic Traits, TIG, 8, 1992.

MICHELMORE, R.W. and MEYERS, B.C., Clusters of Resistance Genes in Plants Evolve by Divergent Selection and a Birth-and-Death Process, *Genome Research*, 8: 1113-1130, 1998.

MICHELMORE, R.W., PARAN, I. and KESSELI, R.V., Identification of Markers Linked to Disease-Resistance Genes by Bulk Segregant Analysis: A Rapid Method to Detect Markers in Specific Genomic Regions by Using Segregating Populations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Genetic, 88: 9828-9832, 1991.

MUEHLBAUER F.J., SIMON, C.J., SPAETH, S.C., and HADDAD N.I., Genetic improvement of chickpea: Key Factors to be considered for a breakthrough in productivity, ICRISAT, 1990.

MUEHLBAUER, F.J. and SINGH, K.B., *Genetics of Chickpea*, ICARDA, 1997.

MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. and ERLICH, H., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor. Sym. Quant. Bio.* 51: 263-273, 1986.

NENE, Y.L., Multiple-Disease Resistance in Grain Legumes, *Annu. Rev. Phtopathology*, 26: 203-217, 1988.

NEVO, E., Genetic Diversity in Wild Cereals: Regional and Local studies and their bearing on Conservation ex-situ and in-situ, *Genetic* 45: 355-370, 1998.

PATERSON, A.H., DNA Marker-assisted crop improvement, *Genome Mapping in Plants*, 1996.

PATERSON, A.H., TANKSLEY, S.D. and SORRELLS, M.E., DNA Markers in Plant Improvement, *Advances in Agronomy*, 1991.

PORTA-PUGLIA, A., BERNIER, C.C., TELLIS, G.J., KAISER, W.J. and REDDY, M.V., Screening Techniques and Sources of Resistance to Foliar Diseases caused by Fungi and Bacteria in Cool Season Food Legumes, Food Legumes, 247-267, 1998.

PRYOR, T., The Origin and Structure of Fungal Disease Resistance Genes In Plants, Trends in Genet, 3: 157-161, 1987.

QIANG Xu, TOMOOKA, N. and VAUGHAN, D.A., Plant Genetic Resources: AFLP Markers for characterizing the Azuki Bean Complex, Crop Science 40, 808-815, 2000.

RATNAPARKHE, M.B., TEKEOĞLU, M. and MUEHLBAUER, F.J., Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters, Theor Appl Genet, 97: 515-519, 1998.

REDDY, M.V. and SINGH, K.B., Evaluation of a World Collection of Chickpea Germplasm Accessions for Resistance to Ascochyta blight, Plant Disease 68: 900-901, 1984.

RHEENEN, H.A., BOND, D.A., ERISKINE, W. and SHARMA B., Future Breeding strategies for Pea, lentil, faba bean and Chickpea, World Crops, ISBN 90-247-3641-2, 1014-1029, 1988.

RIBAUT, J.M., HU, X., HOISINGTON, D., and GONZALES, D., Use of STSs and SSRs as Rapid and Reliable Preselection Tools, in a Marker-Assisted Selection-Backcross Scheme, Plant Molecular Biology, 154-162, 1997.

SAIKI, R.A., Amplification of Genomic DNA. In: PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Innis M.A., GELFAND D.H., SNINSKY J.J. and WHITE T.J. (Ed.) Academic Pres. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, 1990.

SAIKI, R., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A. and ARNHEIM, N., Enzymatic Amplification of β -globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnostic of Sickle-Cell Anemia. Science, Vol: 230, 1350-1354, 1985.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., and MANIATIS, T., Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press., 1989.

SANTRA, D.K., TEKEOĞLU, M. and MUEHLBAUER, F.J., Tagging and Mapping of Ascochyta blight Resistance Genes in Chickpea (*C. arietinum* L.) using Recombinant Inbred Lines, Plant and Animal Genome VI, 1998.

SAXENA, M.C. and VARMA, S., Faba beans, kabuli chickpeas, and lentils in the 1990s,

SENIOR, M.L. and HEUN, M., Mapping Maize Microsatellites and Polymerase Chain Reactions Confirmation of the targeted Repeats using a CT primer Genome, 36: 884-889, 1993.

SHARMA, R.P., and MOHAPATRA, T., Molecular mapping and tagging of genes in crop plants, Genetica, 97: 313-320, 1996.

SIMON C.J. and MUEHLBAUER F.J., Construction of a Chickpea Linkage Map and Its Comparison with Maps of Pea and Lentil, Journal of Heredity, 88:115-119, 1997.

SINGH, K.B., Chickpea Breeding, ICARDA, 127-160, 1998.

SING, K.B., Winter Chickpea: Problems and Potential in the Mediterranean Region, ICARDA, 25-34, 1990.

SINGH, K.B., BEJIGA, G. and MALHOTRA, R.S., Associations of some characters with Seed Yield in Chickpea Collections, *Euphytica* 49: 83-88, 1990.

SINGH, K.B. and REDDY, M.V., Inheritance of resistance to *Ascochyta* blight in chickpea, *Crop Science*, 23: 1-10, 1983.

SINGH, K.B. and REDDY, M.V., Sources of resistance to *Ascochyta* blight in Wild Cicer species, *Neth. J. Plant Path.* 99: 163-167, 1993.

SINGH, K.B. and REDDY, M.V., Genetics of Resistance to *Ascochyta* blight in Four Chickpea Lines, *Crop Sci*, 29: 657-659, 1989.

SINGH, G. and KAUR, L., Chickpea Response to Various Races of *Ascochyta rabiei*, 10 ICN 19, 1988.

SINGH, K.B. and OCAMPO, B., Exploitation of Wild Cicer species for yield improvement in Chickpea, *Theor Appl Genet*, 95:418-423, 1997.

SINGH, K.B. and REDDY, M.V., Patterns of Resistance and Susceptibility to Races of *Ascochyta rabiei* Among Germplasm Accessions and Breeding Lines of Chickpea, *Plant Disease*, 127-129, 1990.

SOUTHERN, E.M., Gel Electrophoresis of Restriction Fragments. *Methods. Enzymol.* Vol: 68, 152-176, 1979.

- STICHER, L., MAUCH-MANI, B., and METRAUX, J.P., Systemic Acquired Resistance, *Annu. Rev. Phytopathology*, 35: 235-270, 1997.
- STUBER, C.W., Biochemical and molecular markers in Plant breeding plant Breeding Review, 1997.
- ŞEHİRALİ, S., Yemeklik Dane Baklagiller, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Ziraat İşleri Genel Müdürlüğü, Ankara, 4-50, 1996.
- TAHİR M, SIMON, C.J. and MUEHLBAUER, F.J., Gene map of lentil: Review, *Lens Newsletter*, 20 (2), 1993.
- TANSLEY, S.D. and MCCOUCH, S.R., Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild, *Science*, 277, 1997.
- TANKSLEY, S.D., YOUNG, N.D., PATERSON, A.H. and BONIERBALE M.W., RFLP Mapping in Plant breeding: New Tools for an old Science, *Biotechnology*, 1989.
- TEKEOĞLU M., SANTRA, D.K., KAISER, W.J., and MUEHLBAUER, F.J., Ascochyta blight resistance inheritance in three chickpea Recombinant Inbred Line Populations, *Crop Sci.* 40, 2000.
- TEWARI, S.K. and PANDEY, M.P., Genetics of resistance to Ascochyta blight in Chickpea (*Cicer arietinum L.*), *Euphytica* 35: 211-215, 1986.
- TORRES, A.M., WEEDEN, N.F., and MARTIN, A., Linkage among Isozyme, RFLP, and RAPD markers in *Vicia faba*, *Theor Appl Genet* 85: 937-945, 1993.

- TULLU, A., KAISER, W.T., KRAFT, M.J. and MUEHLBAUER, F.I., A second gene for resistance to race 4 of Fusarium wilt in chickpea and linkage with a RAPD marker, *Euphytica*, 43-50, 1999.
- VAN der MAESEN, L.J.G., Chickpea (*Cicer arietinum* L.) a monograph of the genus, with special reference to the Chickpea (*Cicer arietinum* L.) its ecology and cultivation. H. Veenman Q. Zonen N.V. 72-10. Wageningen, Netherlands, 342, 1972.
- WANG, G.L. and PATERSON, A.H., Assessment of DNA pooling strategies for mapping of QTLs, *Theor Appl Genet* 88: 355-361, 1994.
- WEEDEN, N.F., ELLIS T.H.N., TIMMERMAN, G.M., SIMON, C.J., TORRES, A.M. and WOLKO, B., How Similar are the Genomes of the Cool Season Food Legumes?, Kluwer Academic Pub., 2000.
- WEEDEN, N.F., TIMMERMAN, G.M., HEMMAT, M., KNEEN, B.E. and LODHI, M.A., Inheritance and Reliability of RAPD Markers, *Applications of RAPD Technology to Plant Breeding*, 12-16, 2001.
- WEEDEN, N.F., TIMMERMAN, G.M. and LU, J., Identifying and mapping genes of economic significance, *Food Legumes*, 726-737, 1997.
- WEISING, K., WINTER, P., HUTTEL, B. and KAHL, G., *Microsatellites Markers for Molecular Breeding*, The Haworth Press, 1998.
- WILLIAMS J.G.K., HANAFEY, M.K., RAFALSKI, J.A., and TINGEY, S.V., Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers: *Methods Enzymol.* Vol: 218, 705-740, 1993.

WILLIAMS J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. and TINGEY, S.V., DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Research*, 18, 1990.

WU, R., HU. X. and HAN, Y., *Molecular Genetics and Development Physiology: Implications for Designing Better Forest Crops*, 377-393, 2000.

YEE, E., KIDWELL, K.K., SILLS, G.R. and LUMPKIN T.A., Diversity among selected *vigna angularis* (Azuki) accessions on the Basis of RAPD and AFLP markers, *Crop Sci.* 39: 268-275, 1999.

YOUNG, N.D., *QTL Mapping and Quantitative Disease Resistance in Plants*, *Annu Rev Phytopathology*, 34: 479-501, 1996.

YOUNG, N.D., WEEDEN, N.F., and KOCHERT, G., *Genome Mapping in Legumes (Fam. Fabaceae)*, *Genome Mapping in Plants*, 1996.

ZHAO, X. and GANAL M.W., *Applications of Repetitive DNA Sequences in Plant Genome Analysis*, *Genome Mapping in Plants*, 1996.

ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Konya’da doğdu. İlköğrenimini Konya 19 Mayıs İlkokulunda, Ortöğrenimini Konya Karma Ortaokulunda ve Konya Atatürk Kız Lisesinde tamamladı. 1989 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümüne girdi ve 1993 yılında mezun oldu. Ayrıca 1989-1993 yılları arasında Selçuk Üniversitesi Eğitim Fakültesi’nde Pedagojik Formasyon dersleri aldı. 1995 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü’nde Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 1997 yılında Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı. Aynı yıl Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü’nde Doktora öğrenimine başladı. Halen 1995 yılından beri aynı Enstitüde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. İngilizce ve Almanca bilmektedir.

EKLER

EK 1. DNA izolasyonunda ve moleküler markır analizinde kullanılan Ekstraksiyon Buffer bileşenleri

DNA izolasyonu için 100 ml'lik ekstraksiyon buffer hazırlamak için,

100 mM Tris, pH 8.0

1.4 M NaCl

2 mM EDTA

karışımı hazırlanır. Sonra %2'lik CTAB (hexadecyl tri-methyl-ammonium bromide) dan 2 gram alınarak 58 ml HPLC H₂O'da çözülür. Önceden hazırlanmış karışıma yavaş yavaş ilave edilir. Buffer karışımı otoklavda 30 dakika steril edildikten sonra kullanılır.

EK 1.1. Nuklei Lizis Buffer

1 M Tris-HCl, pH 8.0	200 ml
0.5 M EDTA, pH 8.0	100 ml
5 M NaCl	400 ml
CTAB	20 g
HPLC H ₂ O	300 ml

Karışım otoklavda 30 dakika steril edildikten sonra kullanılır.

EK 1.2. DNA Ekstraksiyon Buffer (minigram)

Sorbitol	63.77 g
Tris	12.10 g
EDTA	1.68 g
HPLC H ₂ O	1 litre

Karışım pH 7.5 olmalı, karışımda kahverengileşme olmaması için 3.802 g/l NaBisülfite eklenir

EK 1.3. TE Buffer pH 7.5

1 M Tris-HCl, pH 7.0	10 ml
5 M EDTA	2 ml
HPLC H ₂ O	1 litre

Karışım 30 dakika otoklavda steril edilir.

EK 1.4. 5XTBE Buffer

Tris Base	54 g
Boric Acid	27.5 g
0.5 M EDTA	20 ml
HPLC H ₂ O	1 litre.

Karışımı deney ortamında kullanmak için 1XTBE hazırlanır.

EK 1.4.1. 1XTBE Buffer

HPLC H ₂ O	800 ml
5XTBE	200 ml

Reaksiyonlarda direkt olarak kullanılır.

EK 1.5. %5' lik Sarkosyl Hazırlama

Sarkosyl (N-lauryl-sarcosine)	50 g
HPLC H ₂ O	1 litre

EK 1.6. EDTA Hazırlama

EDTA	186.1 g
HPLC H ₂ O	1 litre

EK 1.7. NaCl (Sodyum Klorid) Hazırlama

NaCl	146.1 g
HPLC H ₂ O	1 litre

EK 1.8. Chloroform/Isoamyl Alcohol (24:1) Hazırlama

Isoamyl alcohol	167 ml
Chloroform	4 litre

EK 1.9. Blue Juice Hazırlama

10 ml'lik buffer için,	
Bromophenol blue	25 mg
Ficoll-400 (%20)	1.5 g
HPLC H ₂ O	10 ml

EK 1.10. Ethidium-bromide solüsyonu

EtBr (10 mg/ml)	25 µl
HPLC H ₂ O	500 m

Karışım kanserojen olduğu için mutlak surette eldiven giyilmeli ve çalışma çeker ocakta yapılmalıdır.

EK 2. 10XNukes Hazırlama

dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) nükleotidler 9.6 ml HPLC H₂O ile karıştırılarak vortekslenir. Sonra herbiri 1.5 ml olarak mikrotüplere konularak muhafaza edilir.

EK 3. RNase Hazırlama

10 mM Tris-HCl, pH 7.5	50ml
5 M NaCl	15 µl
HPLC H ₂ O	5 µl
RNase	50 mg

EK 4. Markır Hazırlama

TE buffer, pH 7.5	1.5 ml
DNA stok, (Bst-N1)	100 µl
Blue juice	400 µl

Karışımın bulunduğu mikrotüp etiketlenir ve 10 µl'lik markırdan 6 µl kullanılır. Bu markırın yaklaşık olarak 10 µl'si içerisinde 100 ng DNA bulunmaktadır.

EK 5. λ Moleküler Markır Hazırlama

Lamda markır	30 µl
Blue juice	456 µl
TE	1.794 ml

Stok olarak hazırlanan karışımdan çalışma preparatı hazırlanır.

EK 5.1. λ Moleküler Markır (Çalışma preparatı) Hazırlama

λ DNA	29.4 µl
Blue juice	98 µl
TE buffer, pH 8.0	392 µl

EK 6. Jel Hazırlama**EK 6.1. Agaroz Jel Hazırlama (RAPD, ISSR, STMS)**

1XTBE	150 ml
Seakem agarose	1.5 g
Nusieve agarose	1.5 g

EK 6.2. Agaroz Jel (%2)

1XTBE	200 ml
Seakem agarose	2 g
Nusieve agarose	2 g

EK 6.3. Agaroz Jel (%1 - Kalite jeli)

1XTBE	100 ml
Seakem agarose	1 g

EK 7. Primer Hazırlama

Stok preparat için,

Primer	20 µl
TE buffer	180 µl

Çalışma preparatı için,

Stok primerden	20 µl
TE buffer, pH 7.5	180 µl

Çalışmada kullanılacak tüm sarf malzemeler, PCR ürünleri ve izole edilen genomik DNA'lar +4 °C ve -20 °C'de muhafaza edilmelidir.

