

## **BAZI BUĞDAY TESCİLLİ ÇEŞİT VE İLERİ HATLARININ BİYOKİMYASAL MARKÖRLER İLE TANIMLANMASI**

**Gün KIRCALIOĞLU**

**Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü  
P.K. 9, Menemen 35661 – İzmir/TURKEY**

**ÖZ:** Makarnalık buğday genotiplerinin farklılıklarının tanımlanması amacıyla yapılan bu araştırmada glutenin proteini moleküler markör olarak kullanılmıştır. CIMMYT'ten sağlanan toplam 18 makarnalık buğday genotipinin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) tekniği ile glutenin bantları elde edilmiştir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre, materyali oluşturan genotiplerin tamamı kendilerine özgü glutenin bant desenleri oluşturmuşlardır. Çalışmada kullanılan makarnalık buğday genotiplerinin (buğday çeşit ve ileri hatları) birbirlerinden oldukça farklı glutenin bant desenleri oluşturduğu görülmektedir. Literatür bildirişlerine göre glutenin bant desenleri ile buğday ıslah programlarında yer alan hatların ve çeşitlerin tanımlamaları yapılabilmektedir. Ancak aynı pedigr grubunda yer alan genotiplere ait glutenin bant desenleri incelendiğinde bunların genotiplerde mevcut olan benzerliği ortaya koyamadığı gözlenmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), glutenin, buğday, biyokimyasal markör, sodyum dodesil sülfat.

## **IDENTIFICATION OF SOME WHEAT COMMERCIAL VARIETIES AND ADVANCED LINES BY BIOCHEMICAL MARKERS**

**ABSTRACT:** The objective of this study was to identify durum wheat genotypes by using glutenin protein as a molecular marker. Glutenin banding patterns of 18 durum wheat genotypes from CIMMYT collections were obtained by using the SDS-PAGE technique. Evaluation of these glutenin banding patterns showed that these genotypes were totally different from each other and variation among genotypes could be expressed by these patterns. According to the results, it is clear that wheat lines and varieties of breeding programs could be identified with glutenin banding patterns. However, no similarity was observed in the banding patterns of the genotypes in the same pedigree groups.

**Keywords:** Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), glutenin, wheat, biochemical marker, sodium dodecyl sulfate.

## GİRİŞ

Buğday yılda 500 milyon tonluk üretimi ile tüm dünya ülkeleri için büyük önem taşıyan bir tahıldır. Türkiye ise kişi başına buğday tüketiminin en yüksek olduğu ülkelerden biridir ve Türk tüketicisi protein ve kalori ihtiyacının yarısını buğdaydan karşılamaktadır (Brush, 1995).

Buğdayın kalite özelliklerinin belirlenmesinde depo proteinleri önem taşımaktadır. Proteinlerdeki aminoasit diziliş sırası DNA'daki baz diziliş sırasına doğrudan bağlı bulunmaktadır. Bu nedenle proteinler genetik yapının direkt olarak ifade edildiği makro moleküller olup kalıtsal karakterlerin incelenmelerinde kullanılmaları mümkündür. Proteinlerin bu özelliklerinden yararlanabilmek için özel teknikler geliştirilmiştir. Bu tekniklerden birisi de elektroforezdir. Elektroforez tekniği ile buğday genotiplerine özgü protein bantları elde edilmiş ve bazı spesifik protein bantları ile buğday kalite kriterleri arasında bir ilişki kurulmuştur. Bu ilişkilerden yararlanarak buğday ıslah programlarında kalite açısından genetik potansiyeli yüksek çeşitler geliştirilmiştir. Makarnalık buğdaylarla yapılan çalışmalarda gliadin 42 ya da gliadin 45'e bağlı gliadin componentlerinin, hamurun gücüyle ilişkili olduğu ortaya çıkmıştır (Kosmolak ve ark.1980). Otuz bir buğday varyetesine SDS-PAGE uygulaması ile elde edilen gliadin ve yüksek moleküler ağırlıklı (YMA) glutenin alt birimlerinin değerlendirilmesi ile ekmeklik kalitesi yüksek, ıslaha uygun varyeteler seçilmiştir (Cerny ve ark. 1989).

Proteinler, morfolojik ilişkilere göre gen homolojisinin direkt bir ölçüsü olabilirler. Tür içinde mutasyona uğramış gen frekansı arttıkça proteinlerin yük ve mobiliteleri de değişebilir. Poliploid genomlar donör türlerinden direkt olarak aktarıldıkları için protein spektrumları genom donörlerini ortaya koyacaktır. Tritikale'nin çavdar ve buğday ile yapılan karşılaştırmaları amphidiploidlerin ebeveyn proteinlerin toplam spektrumlarından oluşan bir elektroforetik spektrum taşıdığını göstermiştir (Johnson, 1972).

Elektroforez yöntemi ile elde edilen protein bantları genotiplere özgü olduğu için genotipler arasındaki varyasyonun ortaya konması açısından da önem taşımaktadır. Protein elektroforezi kullanılarak cins ve türler arasındaki genetik yakınlığı ortaya koymak amacıyla yapılan ilk çalışmalar Johnson ve Hall, (1965) tarafından gerçekleştirilmiştir.

Gliadin SDS-PAGE uygulamaları dışında depo proteinlerine ya da total proteine değişik elektroforez yöntem uygulamaları da başarılı sonuçlar vermiştir. Bu çalışmalar ile buğday varyeteleri arasında glutenin alt birimleri kompozisyonu

bakımından kesin farklılıklar olduğu ortaya konmuştur (Elton ve ark., 1966; Huebner, 1970).

Glutenin alt birimlerinin nişasta jel elektroforezi (SGE) açılımı net olmayıp izolasyonları zordur. SDS-PAGE uygulaması, glutenin alt birimlerinin daha kolay karakterize olmasını sağlamaktadır (Bietz ve ark., 1972). Benzer çalışmalarla buğdayda en az 20 farklı YMA glutenin alt birimi tesbit edilmiştir (Lawrence ve ark., 1980).

Buğday proteinleri ile ilgili yürütülen çalışmaların çoğu kültür buğdaylarında yapılmıştır. Buğday depo proteinlerinden monomerik gliadinler düşük pH 'da elektroforetik mobiliteleri esas alınarak  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\chi$  ve  $\phi$  gliadinler olarak; polimer olan glüteninler ise moleküler ağırlıklarına göre YMA (yüksek moleküler ağırlıklı) glutenin ve DMA (düşük moleküler ağırlıklı) gluteninler olarak ayrılırlar.

*Triticum aestivum*'da YMA glutenin proteinini kodlayan genler Glu A1, Glu B1 ve Glu D1 olup 1A, 1B ve 1D kromozomlarının uzun kolları üzerinde lokalize olmuşlardır. Her üç lokusta oldukça fazla allelik varyasyon tespit edilmiştir (Payne ve ark., 1983).

Biyokimyasal markörler ile buğday ve tritikale genotipleri tanımlanmış, bu amaçla da en uygun elektroforetik yöntemin araştırılmıştır. Bu çalışmada Elektroforetik yöntemlerden isoelektrik fokuslama (İEF), PAGE, SDS-PAGE kıyaslanmıştır. PAGE (Glisin - Asetik asit) yöntemi buğdaylarda en iyi sonucu vermiştir. En ideal polyakrilamid monomer konsantrasyonu % 6,5 olmuştur. PAGE ve SDS-PAGE yöntemleri tritikalede en iyi sonucu vermiştir (Van de Weghe, 1991) Buğday depo proteinlerinden gliadinlere PAGE uygulanması ile Pakistan ve Türkiye'de kültürü yapılan bazı varyetelerin tanımlamaları yapılmıştır (Chaudhry, 1992).

Çok sayıda araştırmacı yabancı buğdaylarda gliadin ve YMA glutenin alt birimlerini araştırmıştır (Waines ve ark., 1987; Ciaffi ve ark., 1992; Metakovsky ve ark., 1992). Bunların arasında en kapsamlı çalışma 545 örneğin analizini içerenidir. Bu proje kapsamında incelenen yabancı buğdaylarda gliadin ve YMA alt birimleri bakımından geniş bir varyasyon görülmektedir ve gözlenen varyasyonun orijinden kaynaklandığını gözlemek mümkündür (Ciaffi ve ark., 1992). Ciaffi ve ark., tarafından (1993 a, b) Türkiye ve Ürdün'den toplanan *T. dicoccoides* örnekleri ile yapılan bir çalışmada Türkiye ve Ürdün populasyonları arasında Glu-A1, Glu-B1, Gli-B1/Glu-B3 lokusları bakımından genetik farklılık %3 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada dikkati çeken yüksek yerlerden toplanan örneklerde populasyonlar arası genetik

farklılığın fazla olduğunun ortaya konmasıdır. Bu sonuçlar tohum depo proteinde mevcut genetik farklılığın oluşumunda göç ve genetik driftin önemli bir rolü olmadığını göstermektedir. Burada yüksekliğin etkisi yağış, sıcaklık ve radyasyon gibi parametrelerin integrasyonu olarak yorumlanmıştır.

Lafiandra ve ark., (1989) tohum depo proteinlerinin genetik marker olarak gen bankalarında korunan germplazmaların değerlendirilmesinde kullanılabileceğini vurgulamışlardır. Ancak depo proteinlerinde mevcut polimorfizm kalıtsal olarak döllere aktarılabilirse bu durum doğal populasyonlarda daha fazla özelliğin ortaya çıkmasını ve bunlardan ıslah amacıyla yararlanılmasını sağlar. *T. dicoccoides* ile yapılan bir çalışmada tohum depo proteinlerinin adaptasyon yetenekleri incelenmiştir. YMA glutenin alt birimlerinde mevcut varyasyonun bir kısmının fiziksel (iklim, toprak) ve canlı (vejetasyon) değişkenlerden kaynaklandığı ortaya konmuştur (Nevo ve ark., 1987). Benzer olarak bazı *T. dicoccoides* populasyonlarında YMA glutenin alt birimlerinde mevcut olan varyasyonun bu türün farklı habitatlarında görüldüğü açıklanmıştır (Levy ve ark., 1988).

Tohum depo proteinleri elektroforez ile kolayca ortaya konabilmeleri yüksek oranda polimorfik olmaları, genetik kontrolünün basitliği, allellerin kodominantlığı nedeniyle verdikleri desenlerden kolayca belirlenebilmeleri gibi avantajlar taşımaktadırlar. Depo proteinlerinde mevcut yüksek polimorfizm genotiplerin çevre ile ilişkili olarak daha detaylı tanımlanmasını sağlamaktadır. Tek dezavantajları bu proteinleri kodlayan genlerin sınırlı sayıda lokusta yer alması yani bir genomun çok az bir kısmını kapsamasıdır. Progenitörlerin araştırıldığı daha kapsamlı çalışmalarda çok sayıda lokus tarafından idare edilen enzim markerleri ile birlikte kullanılabilmektedirler (Nevo ve ark., 1989).

Buğday depo proteinlerinin evrimsel gelişimin araştırıldığı çalışmalarda kullanılabileceği ileri sürülmüş ve bu çalışmalarda *Ae. longissima* ve *Ae. searsii*'nin kültürü yapılan poliploid buğdaylarda B genom donörü olabileceği ortaya çıkmıştır (Lafiandra ve ark., 1989). Buğdayda çok sayıda DNA markeri ile çalışılmıştır. Çok yoğun olarak kullanılan bir diğer yöntem ise restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi (RFLP)'dir. Kültürü yapılan buğdaylarda yürütülen bir RFLP çalışması bunlarda mevcut polimorfizm seviyesinin oldukça düşük olduğunu (%20-30) göstermiştir. Mikrosatellite, çoğaltılmış fragmentlerde uzunluk polimorfizmi (AFLP) gibi yeni teknikler ile buğdayda polimorfizm araştırmaları sürdürülmektedir (Labhilili ve ark., 1997).

Glutenin ile ilgili çalışmalarda PCR uygulamalarına da yer verilmiştir. Suriye ve Türkiye'den toplanan toplam 11 *T. dicoccoides* populasyonu, PCR tekniği ile

çoğaltılmış DMA glutenin gen sekansları ile değerlendirmiştir. Bu çalışmanın sonucunda 11 populasyon 8 farklı DMA paterni vermiştir. Aynı populasyonlarda YMA glutenin gen sekansları araştırılmıştır. PCR ile çoğaltılan materyal Southern Blot Tekniği ile naylon filtreye transfer edilmiş, onu takiben DMA glutenin için özel bir “probe” kullanılarak eşleme (hibridizasyon) yapılmıştır. Burada 11 populasyonda 4 farklı YMA kalıbı gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda da genetik kökeni yakın olan populasyonlarda aynı aralık ve sayıda bant gözlemlenirken populasyonlar arası farklılık farklı ağırlıkta ekstra bir bant olarak gözlenmiştir (Pogna ve ark., 1988; Pogna ve ark., 1990).

Bu çalışmada SDS-PAGE (sodyumdodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi) tekniği ile toplam 16 makarnalık ve 1 ekmeklik buğday genotipine ait glutenin bantları elde edilmiş ve bu genotiplerin farklılıklarının belirlenmesi amacıyla glutenin proteinin moleküler markör olarak kullanılma durumu araştırılmıştır.

## **MATERYAL VE METOT**

Çalışma 1996-1997 yıllarında Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Moleküler Biyoloji laboratuvarında yürütülmüştür.

### **MATERYAL**

Çalışmada materyal olarak CIMMYT’den sağlanan 16 makarnalık çeşit ve ileri hat ile 1 ekmeklik buğday çeşidinden oluşan toplam 17 adet genotip değerlendirilmiştir. Materyalin pedigrileri Çizelge 1’de verilmiştir.

### **METOT**

#### **Glutenin bantlarının SDS-PAGE yöntemi ile elde edilmesi**

#### **Glutenin ekstraksiyonu**

Glutenin proteinlerinin ekstraksiyonu için NG ve Bushuk (1987) tarafından geliştirilmiş SDS-PAGE yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır.

Un haline getirilmiş buğday tohumlarından 0,5 g’lık örnekler 10 ml hekzan ile 10 dakika karıştırılmış sonra düşük devirde (1000 rpm) 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra tüpün üst fazı atılmış, tüpün dibine çöken alt fazı oda sıcaklığında kurutularak hekzan tamamen uçurulmuştur. Bu işlemin amacı örnekten yağı uzaklaştırmaktır.

Kurutulmuş örneklerin üzerine 1 M NaCl çözeltisinden 10 ml eklenerek 15 dakika karıştırılmış, bu işlemi takiben düşük devirde (1000 rpm) 1 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz uzaklaştırıldıktan sonra alt faz alınmış, üzerine aşağıda formülü verilen ekstraksiyon tamponundan 10 ml konularak 40 °C'de 20 dakika karıştırılmıştır. 8000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilen bu karışım santrifüj sonrası glutenin ekstraksiyonu ve nişasta olarak ikiye ayrılmış olur. Tüpün üst fazını glutenin ekstraksiyonu, alt fazını ise nişasta oluşturmaktadır.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan buğday çeşit ve ileri hatları.

Table 1. Wheat varieties and advanced lines used in the study.

| Çeşit no<br>Variety no | Pedigri (Pedigree)   |
|------------------------|--|
| 2                      | CUMPAS (Ekmeklik Buğday – BW)  |
| 4                      | MEXICALI=MEXI75  |
| 5                      | YAVAROS79=YAV79 (CM9799)   |
| 6                      | ALTAR84 (CD2344)   |
| 7                      | ACONCHI89  |
| 8                      | RYPS-1 (CD58226-3M-2Y-6M-1Y-2M-0Y)   |
| 9                      | RYPS-3 (CD58226-9M-2Y-8M-1Y-1M-1Y-0M)  |
| 10                     | MARECA-2 (CD56986-1Y-9B-1Y-4M-1Y-0M)   |
| 11                     | SILVER-15 (CD66589-D-1M-2Y-4M-1Y-0M)   |
| 12                     | CHEN/ALTAR84 (CD57005-1Y-5B-4Y-1M-0Y)  |
| 13                     | AJAIA-11 (CD58238-6Y-1M-3Y-3M-1Y-0 M)  |
| 15                     | ALTAR84/ALD (CD68153-16Y-2M-2Y-0M)   |
| 16                     | FINFOOT-5 (CD56985-5Y-7M-2Y-1M-2Y-0M)  |
| 17                     | BR180/3/DK60.120/LDS//64.210/4/BERK/5/HUI/6/ALG86/<br>RU (CD62077-E-2Y-2M-1Y-2B-1Y-0B) |
| 18                     | DUKEM-15 (CD68653-C-3Y-1B-1Y-0B)   |
| 19                     | 61.130/414.44/VLNV/3/SWAN (CD56744-5Y-3Y-2B-1Y-0B)                                     |
| 20                     | HUI//CIT71/CII (CD64242-3M-1Y-3M-1Y-0M)  |

Her bir örneğe ait glutenin ekstraksiyonundan 100 µl tüplere alınmış, 90 sn'lik sıcak su banyosunu takiben buzlukta 1-2 dakika bekletilerek yüklemeye hazır hale getirilmiştir.

**Ekstraksiyon tamponunun formülü**

1 molar 6 ml Tris (pH 8)  
30 ml % 10'luk SDS

5 ml 2-ME  
10 ml Gliserol  
0,01 g pyronin  
Destile su

Bir miktar destile su ilave edilerek solüsyonun pH'sı 6,8'e ayarlanmış sonra solüsyon destile su ile 100 ml 'e tamamlanmıştır

### **Polyakrilamid jelin oluşturulması**

#### **1. Monomer çözelti (%30 T, %2,7 Bis)**

Akrilamid 58,4 g  
Bisakrilamid 1,6 g  
Distile su ile 200 ml' ye tamamlanmış ve buzdolabında saklanmıştır.

#### **2. Alt jel tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)**

Tris 36,3 g  
HCl ile pH 8,8'e ayarlanmış, distile su ile 200 ml' ye tamamlanmıştır.

#### **3. Üst jel tamponu (0,5 M Tris-HCl , pH 6,8)**

Tris 3 g  
HCl ile PH 6,8'e ayarlanmış, destile su ile 50 ml'e tamamlanmıştır.

#### **4. % 10 SDS**

SDS 50 g  
Destile su ile 500 ml' ye tamamlanmıştır.

#### **5. APS (%10 Amonyum persülfat)**

0,5 g APS destile su ile 5 ml' ye tamamlanmıştır. Kullanımdan hemen önce hazırlanmıştır.

Çizelge 2. Polyakrilamid jelin oluşturulması için kullanılan çözeltiler.

Table 2. Necessary solutions for polyacrylamide gel formation.

| Çözeltiler<br>Solutions | Alt jel<br>Lower gel | Üst jel<br>Upper gel |
|-------------------------|----------------------|----------------------|
| Monomer çözeltisi       | 6,6 ml               | 1,33 ml              |

|                 |        |        |
|-----------------|--------|--------|
| Alt jel tamponu | 5 ml   | -      |
| Üst jel tamponu | -      | 2,5 ml |
| % 10 SDS        | -      | -      |
| APS             | 100 µl | 50 µl  |
| Temed           | 6,6 µl | 5 µl   |

Alt jel için gerekli çözeltiler Çizelge 2'de verilen oranlarda erlene konduktan sonra vakumlanmıştır. Yüklemeden hemen önce APS ve Temed eklenerek karıştırılmış ve elektroforez aletinin iki cam plakası arasına bir enjektör yardımı ile aktarılmıştır. Polimerasyonu sağlamak için n-Bütanol (suya doymuş n-Bütanol) eklenmiş, polimerasyon sağlandıktan sonra atılmıştır

Alt jelin polimerasyonundan sonra Çizelge 2'de verilen oranlarda üst jel hazırlanıp benzer şekilde aktarılmıştır. Aktarma işlemi takiben örneklerin yükleneceği tarak yerleştirilmiş ve üst jelin polimerasyonu sağlanmıştır.

### **Örneklerin jele yüklenmesi ve SDS-PAGE elektroforezi**

Çalışmada Hoefer Scientific Instruments, SE 400 marka dikey bir elektroforez aleti kullanılmıştır.

Örneklerin yüklenmesinden önce gözlerde kalan hava kabarcıklarını önlemek amacıyla jel gözleri elektrot tamponu ile yıkanmış sonra her örnekten 100 µl alınarak gözlerle yüklenmiştir. SDS-PAGE elektroforezine başlamadan önce formülasyonu aşağıda verilen elektrot tamponundan 400 ml hazırlanmış, alt tampon tankına 200 ml üst tampon tankına da 200 ml elektrot tamponu konmuştur.

#### **Elektrot tamponu(1x)**

(0,025 M Tris, 0,192 M Glisin, %1 SDS, pH 8,3)

2 g Tris

57,6 g Glisin

%10 SDS 40 ml

Bu karışım destile su ile 4 lt'ye tamamlanmıştır. Elektroforez süresince 50 mA sabit akım kullanılmıştır. Başlangıç voltajı 150 V bitiş voltajı 300 V olmuştur. Bu koşullar altında elektroforez pyronine bantı jelin sonuna ulaşana kadar devam etmiştir. Bu süre yaklaşık olarak 3-4 saattir.



### **Jellerin boyanması ve yıkanması**

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jeller boyama kabına alınmıştır.

Jelleri boyamak amacıyla iki tip boya çözeltisi kullanılmıştır.

#### **a. Coomassie Blue çözeltisi (Anonymous, 1995).**

0,5 g Coomassie Blue R-250  
800 ml Methanol  
145 ml Asetik asit

Coomassie Blue ile boyanan jeller yaklaşık 8 saat kadar destain solüsyonunda bekletilmiştir. Destain solüsyonu ile yapılan yıkamadan sonra bantlar görülür hale gelmiştir.

#### **b. Nigrosin çözeltisi (Smithies, 1955)**

0,5 g Nigrosin  
175 ml Methanol  
65 ml Asetik asit  
260 ml Distile su

Jeller Nigrosin içinde sadece 5 dakika bekletilmiştir. Nigrosin çözeltisi boşaltıldıktan sonra jeller destain solüsyonuna alınmış ve bir gece burada bekletilmiştir. Bu işlemden sonra bantlar elde edilmiştir.

### **Jellerin değerlendirilmesi**

Jeller bir cam plaka üzerine yerleştirildikten sonra plakanın altından verilen bir ışık yardımı ile örnekler için bant desenleri oluşturulmuş ve bantların rölatif mobiliteleri hesaplanmıştır.

#### **Bantların yorumlanmasında ele alınan kriterler;**

- a. Örnekler için bant sayıları
- b. Bantların rölatif mobiliteleri (Rf değerleri)

$R_f = \frac{\text{Bandın orijinden uzaklığı}}{\text{İndikatör boyanın (pyronine) orijinden uzaklığı}}$

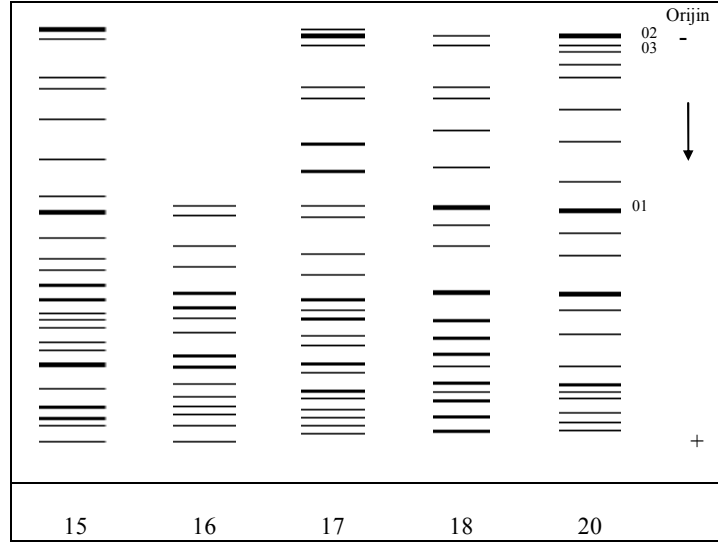
## **BULGULAR**

Çalışmada ele alınan genotiplere ait glutenin bantları Şekil 1 'de verilmiştir.

Bant sayıları genel olarak değerlendirildiğinde; genotipler 16-27 arasında değişen sayıda bant vermiş olup, tümü kendilerine özgü bant desenleri oluşturmuşlardır. En az sayıda bant veren çeşit Yavaros 79 (genotip no 5) olmuştur. Bu grupta en fazla sayıda bantı Silver-15 (genotip no 11) makarnalık buğday ileri hattı vermiştir.

İncelenen buğday genotiplerinde (Şekil 1 ve 2) O1, O2 ve O3 olarak gösterilen üç ortak bant mevcuttur.

Şekil 1. Buğday çeşit ve ileri hatlarına ait glutenin bantları (Genotip no: 2-13).  
Figure 1. Glutenin banding patterns of wheat genotypes (Genotype no: 2 –13).



Şekil 2. Buğday çeşit ve ileri hatlarına ait glutenin bantları (Genotip no: 15-20).  
Figure 2. Glutenin banding patterns of wheats genotypes (Genotype no: 15-20).

O1 bandı Cumpas, Ryps-1, Ryps-3, Mareca-2, Silver-15, Chen/Altar 84, Ajaia-11, Altar 84/Ald, Dukem-15 ve Hui//Cit 71/CII (genotip numaraları sırasıyla, 2, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 18 ve 20) çeşit ve ileri hatlarında mevcuttur.

O2 ve O3 bantları ise birlikte görülmektedir. O2 ve O3 bantlarının mevcut olduğu çeşit ve ileri hatlar Ryps-1, Ryps-3, Mareca-2, Silver-15, Chen/Altar 84, Ajaia-11, Altar 84/Ald ve Hui//Cit711/CII (genotip numaraları sırasıyla 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15 ve 20) çeşit ve ileri hatlarıdır.

Bu sonuçlara göre O1 bantının frekansı 0,62 olarak gerçekleşmektedir. O2 ve O3 bantlarının frekansları ise 0,50 olmuştur.

Ortak F1 melezinden geliştirilmiş olan Ryps-1 ve Ryps-3 (genotip no 8, 9) ileri hatları O1, O2 ve O3 bantlarını taşımaktadır. Ancak oluşturdukları glutenin bant deseni bakımından oldukça farklı oldukları görülmektedir.

Çizelge 3. Buğday çeşit ve ileri hatlarına ait glutenin Rf değerleri (Genotip no: 2-13).  
Table 3. Glutenin Rf values of wheat genotypes (Genotype no: 2 –13).

| Bant | Genotip no (Genotype) |
|------|-----------------------|
|------|-----------------------|

G. KIRCALIOĞLU: BAZI BUĞDAY TESCİLLİ ÇEŞİT VE İLERİ HATLARININ  
BİYOKİMYASAL MARKÖRLER İLE TANIMLANMASI

| no   | 2                             | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   |
|------|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Bant | Bant sayısı (Number of bands) |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| no   | 24                            | 22   | 16   | 18   | 20   | 22   | 25   | 25   | 27   | 18   | 24   |
| 27   |                               |      |      |      |      |      |      |      | 0,12 |      |      |
| 26   |                               |      |      |      |      |      |      |      | 0,15 |      |      |
| 25   |                               |      |      |      |      |      | 0,12 | 0,12 | 0,18 |      |      |
| 24   | 0,13                          |      |      |      |      |      | 0,15 | 0,15 | 0,20 |      | 0,12 |
| 23   | 0,17                          |      |      |      |      |      | 0,18 | 0,18 | 0,25 |      | 0,15 |
| 22   | 0,19                          | 0,16 |      |      |      | 0,12 | 0,21 | 0,21 | 0,30 |      | 0,22 |
| 21   | 0,24                          | 0,18 |      |      |      | 0,15 | 0,24 | 0,26 | 0,39 |      | 0,24 |
| 20   | 0,26                          | 0,20 |      |      | 0,15 | 0,22 | 0,39 | 0,39 | 0,50 |      | 0,27 |
| 19   | 0,30                          | 0,24 |      |      | 0,18 | 0,24 | 0,49 | 0,49 | 0,53 |      | 0,50 |
| 18   | 0,36                          | 0,30 |      | 0,15 | 0,22 | 0,49 | 0,56 | 0,53 | 0,54 | 0,12 | 0,54 |
| 17   | 0,39                          | 0,33 |      | 0,18 | 0,24 | 0,51 | 0,59 | 0,56 | 0,56 | 0,15 | 0,55 |
| 16   | 0,45                          | 0,39 | 0,16 | 0,21 | 0,29 | 0,55 | 0,61 | 0,60 | 0,57 | 0,22 | 0,58 |
| 15   | 0,54                          | 0,45 | 0,36 | 0,26 | 0,45 | 0,58 | 0,63 | 0,61 | 0,58 | 0,24 | 0,63 |
| 14   | 0,62                          | 0,50 | 0,39 | 0,45 | 0,48 | 0,61 | 0,64 | 0,63 | 0,63 | 0,27 | 0,66 |
| 13   | 0,64                          | 0,54 | 0,45 | 0,48 | 0,52 | 0,63 | 0,66 | 0,66 | 0,64 | 0,50 | 0,71 |
| 12   | 0,66                          | 0,57 | 0,51 | 0,52 | 0,58 | 0,65 | 0,69 | 0,68 | 0,67 | 0,54 | 0,73 |
| 11   | 0,69                          | 0,60 | 0,54 | 0,54 | 0,61 | 0,69 | 0,70 | 0,69 | 0,70 | 0,57 | 0,76 |
| 10   | 0,71                          | 0,63 | 0,58 | 0,57 | 0,64 | 0,71 | 0,73 | 0,72 | 0,72 | 0,60 | 0,79 |
| 9    | 0,73                          | 0,66 | 0,63 | 0,60 | 0,67 | 0,73 | 0,76 | 0,76 | 0,74 | 0,67 | 0,81 |
| 8    | 0,77                          | 0,69 | 0,66 | 0,65 | 0,69 | 0,77 | 0,79 | 0,79 | 0,75 | 0,72 | 0,82 |
| 7    | 0,81                          | 0,72 | 0,69 | 0,69 | 0,72 | 0,81 | 0,81 | 0,81 | 0,80 | 0,76 | 0,84 |
| 6    | 0,83                          | 0,73 | 0,73 | 0,71 | 0,75 | 0,82 | 0,84 | 0,85 | 0,81 | 0,80 | 0,85 |
| 5    | 0,86                          | 0,75 | 0,76 | 0,75 | 0,78 | 0,84 | 0,85 | 0,88 | 0,85 | 0,82 | 0,87 |
| 4    | 0,89                          | 0,77 | 0,78 | 0,78 | 0,81 | 0,88 | 0,89 | 0,91 | 0,88 | 0,84 | 0,90 |
| 3    | 0,91                          | 0,81 | 0,81 | 0,81 | 0,87 | 0,92 | 0,90 | 0,93 | 0,93 | 0,86 | 0,92 |
| 2    | 0,94                          | 0,87 | 0,84 | 0,87 | 0,93 | 0,95 | 0,95 | 0,95 | 0,96 | 0,90 | 0,94 |
| 1    | 0,98                          | 0,96 | 0,95 | 0,97 | 0,97 | 0,98 | 0,98 | 0,98 | 0,98 | 0,93 | 0,98 |

Çizelge 4. Buğday çeşit ve ileri hatlarına ait glutenin Rf değerleri (Genotip no: 15-20).  
Table 4. Glutenin Rf values of wheat genotypes (Genotype no: 15 –20).

| Bant no<br>Bant no            | Genotip no (Genotype no) |    |    |    |    |
|-------------------------------|--------------------------|----|----|----|----|
|                               | 15                       | 16 | 17 | 18 | 20 |
| Bant sayısı (Number of bands) |                          |    |    |    |    |
|                               | 24                       | 16 | 24 | 19 | 21 |
|                               |                          |    |    |    |    |

|    |      |      |      |      |      |
|----|------|------|------|------|------|
| 24 | 0,05 |      | 0,05 |      |      |
| 23 | 0,08 |      | 0,08 |      |      |
| 22 | 0,16 |      | 0,09 |      |      |
| 21 | 0,19 |      | 0,19 |      | 0,08 |
| 20 | 0,25 |      | 0,21 |      | 0,09 |
| 19 | 0,35 |      | 0,28 | 0,08 | 0,12 |
| 18 | 0,43 |      | 0,36 | 0,09 | 0,14 |
| 17 | 0,47 |      | 0,45 | 0,19 | 0,16 |
| 16 | 0,52 | 0,45 | 0,48 | 0,22 | 0,24 |
| 15 | 0,57 | 0,48 | 0,56 | 0,28 | 0,32 |
| 14 | 0,60 | 0,54 | 0,61 | 0,36 | 0,40 |
| 13 | 0,62 | 0,59 | 0,66 | 0,45 | 0,46 |
| 12 | 0,66 | 0,64 | 0,68 | 0,49 | 0,52 |
| 11 | 0,69 | 0,68 | 0,71 | 0,54 | 0,56 |
| 10 | 0,71 | 0,70 | 0,74 | 0,64 | 0,65 |
| 9  | 0,72 | 0,73 | 0,76 | 0,72 | 0,69 |
| 8  | 0,76 | 0,79 | 0,80 | 0,76 | 0,76 |
| 7  | 0,77 | 0,81 | 0,83 | 0,79 | 0,82 |
| 6  | 0,80 | 0,85 | 0,87 | 0,82 | 0,83 |
| 5  | 0,86 | 0,88 | 0,88 | 0,85 | 0,87 |
| 4  | 0,90 | 0,90 | 0,91 | 0,87 | 0,88 |
| 3  | 0,92 | 0,92 | 0,92 | 0,89 | 0,90 |
| 2  | 0,95 | 0,95 | 0,93 | 0,92 | 0,92 |
| 1  | 0,98 | 0,98 | 0,96 | 0,96 | 0,95 |

Altar 84 (genotip no 6) çeşidinin ebeveyn olarak yer aldığı melezlerinden oldukça farklı glutenin bant deseni oluşturduğu görülmektedir. Chen/Altar-84 (genotip no 12) ve Altar 84/Ald (genotip no 15) melezlerinin glutenin bant desenlerinde büyük benzerlikler görülmekte olup O1, O2 ve O3 bantları mevcuttur.

İncelenen genotipler az sayıda, ancak benzer YMA glutenin bantları vermiştir. Sayıca fazla olan DMA glutenin bantları arasında benzerlik görülmemiştir. Genel olarak glutenin bantları çeşitlere özgü bir desen oluşturmaktadır. Deneme materyaline ait Rf değerlerinin 0,08 – 0,98 arasında olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3, 4).

Burada dikkati çeken bir diğer durum gözlenen glutenin kombinasyonlarının sayıca fazla olmasıdır. Buğday çeşitlerine ait gluten kombinasyonları bazı araştırmacılar tarafından incelenmiş, biyokimyasal varyasyon ile kombine olan çok sayıda genin

mevcudiyetinden dolayı gliadin ve glutenin alt birimlerinin olası kombinasyonlarının sonsuza yakın olduğu ortaya konmuştur (Primard ve ark., 1991). Çalışmada kullanılan makarnalık buğday genotiplerinin glutenin bant desenleri arasındaki benzerlik ve ortak bantların yüksek frekansı dikkat çekmektedir. Bu durum, makarnalık buğday genotiplerinin tetraploid yapısından kaynaklanabileceği gibi bu genotiplerin tamamının Meksika orijinli olmasından da kaynaklanabilir.

Araştırmada kullanılan buğday genotiplerine ait glutenin bantlarının genel olarak pedigrilerde mevcut benzerliği yansıtmadığı görülmektedir. Bu durum bazı araştırmacılar tarafından da tesbit edilmiş ve aynı pedigri grubunda yer alan bazı ıslah hatlarının farklı glutenin desenleri oluşturduğu, farklı pedigri grubunda yer alan hatların benzer glutenin desenleri meydana getirdiği açıklanmıştır (Du Cros ve ark., 1980). Ayrıca, bu proteini kodlayan genlerin sınırlı sayıda lokus içermesi yani bir genomun çok az bir kısmını kapsaması nedeniyle pedigri grubunda mevcut benzerliği tamamen ortaya koymaları mümkün değildir (Nevo ve ark., 1989).

Araştırmadan elde edilen bulgulara göre, SDS-PAGE tekniği ile elde edilen glutenin bantlarının çevre koşullarından etkilenmediği ve polimorfik yapısı nedeniyle glutenin alt birimlerinin genotiplerin tanımlanmasında kullanılabileceği açıktır. Ancak ortak glutenin bantlarının varlığına rağmen glutenin bant desenlerinin, genotiplerin genetik yakınlığını açıklayamadığı gözlenmiştir. Gözlenen ortak bantların da genotiplerin pedigrileri ile ilişkili olmadığı dikkat çekmektedir.

Özetle, bu çalışmada SDS-PAGE tekniği ile glutenin bantları elde edilmiş, buğday genotiplerinin tanımlamaları yapılmıştır. Çalışmada kullanılan buğday genotiplerinin birbirlerinden oldukça farklı glutenin bant desenleri oluşturduğu saptanmıştır. Bu nedenle buğday ıslah programlarında yer alan genotiplerin tanımlanmasında kullanılmaları mümkündür. Buğday genotiplerine SDS-PAGE tekniği uygulanarak elde edilen glutenin bantları genotiplerde mevcut varyasyonu ortaya koymakta, genotiplerin genetik farklılığı bantlara yansımaktadır. Ancak pedigrilerinde benzerlik olan genotiplere ait glutenin bant desenleri incelendiğinde genetik olarak benzerliğin yansımadığı görülmektedir. Bu nedenle akrabalık ilişkilerinin araştırıldığı çalışmalarda buğday genotiplerinin glutenin elektroforegramlarının çeşitli enzimlere ait zymogramlarla birlikte değerlendirilmesi daha uygun olacaktır. Ayrıca son zamanlarda kullanım alanı bulan PCR (polimerase chain reaction= polimeraz zincir reaksiyonu) tekniği ile de buğday genotiplerinin daha kapsamlı olarak tanımlanmaları mümkündür. Bu teknik ile çoğaltılmış glutenin gen sekanslarının değerlendirilmesi ile genotiplerin genetik olarak yakınlık ve uzaklık durumlarının açıklanabileceği bildirilmiştir (Labhilili ve ark. 1997).

Buğday tüm dünyada olduğu gibi Türkiye açısından da önemli bir tahıldır. Her yıl çok sayıda çeşit piyasaya sunulmaktadır. Ancak bunların mevcut çeşitlerden farklılığı ise genetik olarak araştırılmamaktadır. Bu nedenle halen kullanılmakta olan buğday çeşitlerinin genetik olarak tanımlamaları yapılmalı, markör olarak kullanılan protein ya da enzime göre elde edilen parmak izleri ile çeşitlere ait bir katalog oluşturulmalıdır.

### LİTERATÜR LİSTESİ

- Anonymous. 1995. Sigma. Biochemicals Organic Compounds and Diagnostic Reagents. Sigma Chemical Company. St Louis, MO, USA.
- Bietz, J. A., and J. S. Wall. 1972. Wheat gluten subunits: Molecular weights determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Cereal chem.* 49: 416-432.
- Bietz, J. A. 1987. Wheat and wheat improvement agronomy. Monograph.no:13 (2<sup>nd</sup> edition).
- Brush, S. B. 1985. Ethno biologists Comb Turkey's Rich Wheat Trove in Search of Patterns of Diversity. *Diversity*, vol. 3 No 1 , 2.
- Cerny J., A. Sasek, J. Kubanek, and J. Maly. 1989. Electrophoretic spectra of gliadins and high molecular weight glutenin subunits of some winter wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties from the world collection. *Sbornik-UVTIZ,-Potravinarske-Vedy*, 1989, 7:1, 15-27; 20 ref.
- Chaudhry M. A. 1992. Identification of some wheat varieties by the electroforetic analyses of gliadin proteins. Doktora tezi, Ankara üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Ciaffi, M., L., D. Lafiandra, and E. Proceddu. 1992. Seed storage proteins of wild wheat progenitors and their relationships with technological properties. *Hereditas* 116: 315-22.
- Ciaffi, M., D. Lafiandra, E. Porceddu, and S. Benedettelli. 1993 a. Storage protein variation in wild emmer wheat (*Triticum turgidum* ssp. *dicocoides*). from Jordan and Turkey. I. Electrophoretic characterization of genotypes. *Theor. Apply. Genet.* (in press).



- Ciaffi, M., D. Lafiandra, E. Porceddu, and S. Benedettelli. 1993 b. Storage-protein variation in wild emmer wheat (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*). from Jordan and Turkey. II. Patterns of allele distribution. Theor. Apply Genet. (in press).
- Du Cross D. L., G. J. Lawrence, D. M. Miskelyand, and C. W. Wrigley. 1980. Systematic identification of Australian wheat varieties by laboratory methods (Csiro wheat Res. unit. tech. publ. 7.).
- Elton, G. A. H., and J. A. D. Eward. 1966. Glutenins and gliadins electrophoretic studies. J. Agric. Food Chem. 17: 34-38.
- Huebner F. R. 1970. Comparative studies on glutenins from different classes of wheat. J. Agric. Food Chem. 18: 256-259.
- Johnson B. L., and O. Hall. 1965. Analysis of phylogenetic affinities in the triticinae by protein electrophoresis. Ame. J. Bot. 52: 506-513.
- Johnson, B. L. 1972. Seed protein profiles and the origin of the hexaploid wheats. Ag. J. Bot. 59: 952-960.
- Kosmolak, F. G., J. E. Dexter, R. R. Matsuo, D. Leisle, and B. A. Marchylo. 1980. A relationship between durum wheat quality and gliadin electrophoregrams Can. J. Plant. Sci. 60: 427-432
- Köksal, H., A. Atlı ve N. Koçak. 1991. Hububat ıslahında yeni yaklaşımlar, Gıda dergisi, 16 (3), 163-168.
- Labhilili, M., E. Imod, M. Baum, and M. M. Nachit. 1997. Techniques in biomolecular analysis. IPGRI Newsletter issue no:14 June 97.
- Lafiandra, D., S. Benedettelli, B. Spagnoletti, P. L. Zevli, and E. Porceddu. 1989. Seed storage proteins and wheat genetic resources. In Srivastava, J.P. and A.B. Damania, A. B. (eds.) Wheat Genetic Resources Meeting Diverse Needs. Chi Chester, VK: John Wiley.
- Levy, A. A., and M. Feldman. 1988. Ecogeographical distribution of HMW glutenin alleles in populations of the wild tetraploid wheat *Triticum turgidum* var. *dicoccoides*. Thear Appl. Genet 75: 651-58.

- Lowrance, G. J., and K. W. Shepherd. 1980. Variation in glutenin subunits of wheat. *Aust. J. Biol. sci* 33: 221-233.
- Metakovsky, E. V., and S. K. Baboev. 1992. Polymorphism of gliadin and unusual gliadin alleles in *Triticum boeoticum*. *Genom* 35: 1007-12.
- Nevo E., and A. Beiles. 1989. Genetic diversity of wild emmer wheat in Israel and Turkey. Structure, evolution and application in breeding. *Theor. Appl. Genet.* 77: 421-455.
- Ng, P. K. W., and W. Bushuk. 1987. Glutenin of marquis wheat as reference for estimating molecular weights of glutenin subunits by SDS-PAGE. *Cereal Chem.* 64 (4): 324-334.
- Payne, P. I., and Gregory J. Lawrence. 1983. Catalogue of alleles for the complex gene loci, Glu-A1, Glu-B1 and Glu-D1 which code for high molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal research communications* Vol: 11, no 1.
- Pogna, N., D. Lafiandra, P. Feillet, and C. Autran. 1988. Evidence for a direct causal effect of low molecular weight subunit of glutenins on viscoelasticity in durum wheat. *J. Cereal. Sci.* 7: 211-214.
- Pogna, N., C. Autran, F. Mellini, D. Lafiandra, and P. Feillet. 1990. Chromosome 1B-encoded gliadin and glutenin subunits in durum wheat: Genetic and relationship to gluten strength. *J. Cereal. Sci.* 11: 15-31.
- Primard, S., R. Graybosch, C. J. Peterson, and J. H. Lee. 1991. *Cereal Chem.* 68 (3): 305-312.
- Sesli, M. 1995. Buğday, çavdar ve tritikale çeşitlerinin biyokimyasal özelliklerine göre tanımlanması. Yüksek lisans tezi. Ege Ü. Fen Bil. Enst. Bornova /İzmir.
- Smithies, O. 1955. Zone electrophoresis in starch gel group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.* 61: 629 - 641.
- Van De Weghe, L. 1991. Comparative study of electrophoretic methods for cultivars identification of wheat and triticale. *Seed sci & Technol.* 19, 91-50.

Varughese, G., E. E. Saari, and B. Skovmand. 1985. International Collaborations Led by CIMMYT promote wheat improvement throughout the Mediterranean. Diversity. Vol. 11. no 1& 2.

Waines, J. G., and P. I. Payne. 1987. Electrophoretic analysis of high molecular weight glutenin subunits of *T. monococcum*, *T. urartu* and A genome of bread wheat (*T. aestivum*). Theor. Appl. Genet. 74: 71-76.