

Hububat Islahında Yeni Yaklaşımlar

Yrd. Doç. Dr. Hamit KÖKSAL, Dr. Ayhan ATLI, Dr. Naile KOÇAK

Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü — ANKARA

1. GİRİŞ

İnsan beslenmesinde yararlanılan en önemli ürün hububattır. Artan nüfus ile birlikte birim alandan elde edilen hububatın miktarını artırmak için uzun yıllardır ıslah çalışmaları sürdürülmektedir. Islah çalışmalarında verim artışının yanında işleme ve besleme kalitesini de artırmak, son yıllarda temel ıslah amaçlarından biri olmuştur.

Islah çalışmaları uzun zaman ve emeğe ihtiyaç gösteren pahalı çalışmalardır. Bunun temel nedeni genetik varyasyonun fazla oluşu ve ıslah edilmesi gereken bazı karakterlerin çevresel faktörlerden etkilenmesidir. Özellikle son 15 yıl içerisinde bilimde görülen gelişmeler daha kısa sürede sonuç verebilen ıslah çalışmalarını gündeme getirmiştir. Bitki ıslahında yeni beklentileri beraberinde getiren gelişmeler daha çok biyokimyasal teknikler, moleküler biyoloji, genetik mühendisliği ve biyoteknoloji gibi çalışma alanlarında olmuştur.

Bu makalede, son yıllarda hububat ıslahında yararlanılan yeni tekniklerden bazısına yer verilecek ve ıslah programlarında kullanıma potansiyelleri irdelenecektir.

2. BAZI GENETİK MARKÖRLERİN HUBUBAT ISLAHINDA KULLANIMI

2.1. Proteinlerin Markör Olarak Kullanımı

2.1.1. Depo Proteinleri

Hububat depo proteinleri sentezlendikten sonra değişmeden endospermde depolandıklarından, hububatın kalıtsal karakterlerini direkt olarak yansıtmaktadırlar. DNA, tüm canlılarda bu kalıtsal karakterleri kontrol eden genlerin yapısını oluşturmaktadır. Hücre bölünmesi sırasında çift zincirli DNA molekülünün kopyası yapılmaktadır (DNA replikasyonu). Bu DNA'lar kalıp olarak kullanılarak mRNA'lar elde edilir. Daha sonra çekirdekten stoplazmaya geçen mRNA'ların bazı dizilişi sentezlenecek olan proteinlerin amino asit dizilimini yönlendirir. Böylece elde edilen proteinin amino asit dizilişi sırası genlerdeki baz dizilişi sırası ile belir-

lenmiş olur. Yani depo proteinlerindeki amino asit dizilişi sırası DNA'daki baz dizilişi sırasına direkt olarak bağlı bulunmaktadır. Bu nedenle proteinler genetik yapının direkt olarak ifade edildiği makromoleküller olup kalıtsal karakterlerin incelenmesinde kullanılmaları mümkündür.

Proteinlerin bu özelliklerinden yararlanabilmek için birçok teknikler geliştirilmiştir. Bu tekniklerin kullanılması ile genetik yapı hakkındaki fikir sahibi olunabilmektedir. Son yıllarda hububat ıslah programlarında, proteinlerin çeşitli özelliklerine göre ayırımını esas alan birçok biyokimyasal yöntemler kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemler elektroforez, HPLC (High Pressure Liquid Chromotography), immünolojik teknikler ve protein dizilim analizleridir. Proteinlerin özelliklerinin bu yöntemlerle saptanabilmesi için önce ekstrakte, izole ve prufiye edilmeleri gerekmektedir. Bu yöntemlerden hububat ıslahında ne şekilde yararlanıldığı aşağıda özetlenmeye çalışılmıştır.

2.1.1.1. Biyokimyasal yöntemlerle çeşit identifikasyonu

Buğday ve arpa ıslah programındaki hatların ve çeşitlerin genetik olarak ayırımında en yaygın olarak kullanılan teknikler elektroforez ve HPLC'dir (BIETZ, 1987).

Protein gibi biyolojik polielektrolitler net yük, şekil ve moleküler büyüklük gibi özellikler bakımından farklılık gösterdiklerinden elektrik alanında veya çeşitli ayırım ortamlarında farklı mobilitelere sahip olup, böylece birbirlerinden ayrılabilirler. Yukarıda açıklanan yöntemlerle gliadin, glutenin, albumin, globulin toplam proteinden yararlanılarak çeşitlerin genetik farklılığını saptamak mümkündür.

Çeşit ayırımında son yıllarda en çok yararlanılan gliadin elektroforez yöntemidir. Bu yöntemde ilk yıllarda nişasta jeli daha sonraki yıllarda da poliakrilamid jel yaygın olarak kullanılmıştır (BUSHUK ve ZILLMAN, 1978; WRIGLEY, 1982). Analizde kullanılan jeldeki farklı-

lığın yanında gradient jel, izoelektrik fokusing, iki boyutlu elektroforez gibi yöntemlerde kullanım sahası bulmuşlardır.

Gliadin elektroforezinde olduğu gibi glutenin, albumin ve globulin elektroforezi ile de çeşit identifikasyonu mümkündür. Fakat albumin ve globulinin daha çok tür ayırımında kullanıldığı (WRIGLEY, 1982) gluteninin ise elektroforezden önce subunitlerine ayrılması gerekliliğinden (BIETZ, 1987 daha az kullanım sahası buldukları bilinmektedir. Toplam proteinin SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez) yöntemi ile buğday çeşitlerinin ayırımında yararlı olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarda açıklanmıştır (FULLINGTON vd., 1980).

HPLC ile de yukarıda bahsedilen tüm protein fraksiyonları kullanılarak çeşitlerin ve ıslah materyalinin genetik ayırımı mümkün olmaktadır (BIETZ, 1983). Bu yöntemin elektroforeze göre daha hassas ve hızlı sonuç vermesidir. Her iki yöntemde çok az miktarda örnek çalışılmaktadır. Bu özellik ise, ıslah programlarının erken generasyon materyalinde tek bir buğday veya arpa tanesi ile dahi seleksiyon yapabilmek imkanı yaratmaktadır.

2.1.1.2. Buğday Kalitesinin Biyokimyasal Yöntemlerle Saptanması

Elektroforez ve HPLC kullanılarak bazı spesifik bant ve pikler ile buğday kalitesi arasında ilişkiler bulunmuştur. Bu ilişkilerden yararlanılarak buğday ıslah programlarında kalite açısından genetik potansiyeli yüksek çeşit geliştirilebilmektedir. Klasik ıslah programlarında çeşit x çevre interaksyonları nedeniyle genetik potansiyel tek bir örnekle saptanamazken, bu özellik biyokimyasal yöntemlerle saptanmakta ve genetik farklılıklar somut bir şekilde ortaya konabilmektedir. Gliadin elektroforegram desenlerinde bulunan 42 ve 45 mobiliteli bantlar ile HPLC kromatogramlarındaki b ve i piklerinin makarnalık buğdayda makarna pişme kalitesi ile ilişkili oldukları saptanmış olup, 45 mobiliteli bant ile «i» pikinin kuvvetli gluten kalitesine sahip durum buğdayını, 42 mobiliteli bant ile «b» pikinin ise zayıf gluten kalitesine sahip durum buğdayını temsil ettiği açıklanmış-

tır (DAMIDAUX, 1978; BURNOUF ve BIETZ, 1984). Bu şekilde ancak deneme tarlasından alınan örneklerde saptanabilecek olan genetik potansiyel tek bir hububat tanesinde dahi ortaya konabilmektedir.

Makarnalık buğdayda kalitenin elektroforez bantları ve HPLC pikleri ile tahmini yanında ekmeleklik buğdayda da yüksek molekül ağırlıklı glutenin subunitleri ile ekmeleklik kalitesi arasında ilişkiler elde edilmiştir (PAYNE vd., 1981). Bu ilişkiden yararlanılarak ıslah programlarında ekmeleklik kalitesi bakımından genetik potansiyeli de biyokimyasal yöntemlerle belirlemek mümkün olacaktır.

Elektroforez ve HPLC'nin çeşit ayırımı ve kalite düzeyinin saptanmasında kullanılması, aşağıda ana başlıkları verilen konularda net bulgular elde edilmesini sağlayacaktır.

- Çeşit saflığının korunması
- Saf tohum yetiştirme
- Pedigri araştırması
- İslahçı haklarının korunması
- İslah programlarındaki hatlarda homojenlik kontrolü
- Erken generasyonlarda başarılı seleksiyon.

Son yıllarda elektroforez ve HPLC teknikleri ayrıca proteinlerin genetik analizi ve türleri arası genetik ilişkileri saptamak amacı ile de ıslah programlarında kullanım sahası bulmuştur (WRIGLEY, 1982; PAYNE, 1984).

Proteinlerin özelliklerinden yararlanılarak genetik yapı hakkında bilgi edinmek için immünolojik yöntemler ve protein dizilimi analizleri de ıslahçı genetikçilerin hizmetindedir. Her proteinin kendine özgü amino asit dizilimi ve konformasyonundan doğan immünolojik özellikleri vardır. Yani bir proteine karşı oluşan antikorlar başka proteinleri tanımazlar ve bu özellikten yararlanılarak farklı proteinler birbirinden ayrılabilirler. Özel antikorlar kullanılarak bir proteinin bir bitki ekstraktında bulunup bulunmadığı ve bulunursa ne miktarda bulunduğu belirlenebilir. Çok spesifik antikorlar allelik ürünleri, yani birbirinden sadece bir amino asit farkı olan iki proteini bile ayırabilir. Bu açıdan spesifik antikorlar elektroforez

ve benzeri yöntemlerden daha güçlüdür (DAUS-SANT ve SKAKOUM, 1983). En yaygın olarak kullanılan immünolojik testlerden birisi ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) testi-dir.

2.2.1. İzoenzimler

Bitkiler arasındaki genetik, biyokimyasal, fizyolojik vb. farklılıkları kalitatif ve kantitatif olarak belirlemede markör olarak kullanılabilen protein gruplarından birisi de izoenzimlerdir. İzoenzim terimi, bir enzimin aynı organizmada bulunan ve substrat spesifitesi aynı veya benzer olan formlarını ifade eder. Esteraz enzimleri gibi bazı izoenzimler bu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır (WU vd., 1984). İzoenzimlerin genetik çalışmalarda kullanımını sınırlayan bir özelliği, elektroforez bant desenlerinin dokulara ve bitki gelişim dönemine bağlı olarak varyasyon gösterebilmesidir.

En az varyasyon genç bitki yapraklarında görüldüğünden, bu dokular genetik çalışmalarda en uygun bitki bölümü olarak kabul edilmektedir. Bu amaçla arıtılmamış ekstrakt içinde bulunan proteinler elektroforetik olarak nişasta ve poliakrilamid jeller üzerinde ayrılırlar. Elde edilen jeller, spesifik enzim aktivitesi ihtiva eden zonları görünür hale dönüştürmek amacıyla özel boyalarla boyanır. Böylece elde edilen bilgiler yorumlanarak genetik farklılık ortaya konulmaya çalışılır.

2.2. Restriksiyon Enzimleri ile Kesilen DNA Parçalarının Markör Olarak Kullanımı

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) adından da anlaşılacağı üzere DNA'nın tip II restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilmesi sonucu elde edilen parça büyüklüklerinin farklılık göstermesi esasına dayanır. Farklılığın ortaya çıkmasının nedeni ise DNA dizilimindeki spesifik farklılıklardır. Enzimle kesme sonucu elde edilen DNA parçaları elektroforez ile büyüklüklerine göre ayrılır ve bir filtre kağıdına aktarılarak immobilize edilir. Daha sonra radyoaktif etiketli bir DNA probu ile hibridize edilir ve otoradyografi ile görünür hale getirilir. RFLP analizleri ile, proba homolog olan veya buna bitişik olan DNA dizilimindeki varyasyon izlenebilir (BECK-

MANN ve SOLLER, 1986; LANDRY ve MICHELMORE, 1987).

RFLP'nin bazı avantaj ve dezavantajları vardır. RFLP ile protein markörlerinin aksine, kromozomlar üzerinde protein sentezinde kullanılmayan bölgelerdeki varyasyon da izlenebilir. RFLP markörlerinin sayısı sınırlı değildir. Çünkü, kopya sayısı az olan DNA parçalarından klonlanan herhangi birisi prob olarak kullanılabilir ve herbir prob için birkaç restriksiyon enzimi denenebilir. Oldukça yakın akraba bireyler arasındaki varyasyon RFLP ile izlenebilir. RFLP'nin doku spesifitesi hakkında henüz bir kayıt yoktur. Fakat RFLP çalışmalarında gerekli olan DNA hazırlama yöntemleri şimdilik, izoenzim ve depo proteini analizlerinde gerekli olan kaba protein ekstraksiyonlarından daha zaman alıcı ve zordur. Bu durum RFLP ile incelenebilecek birey sayısını azaltabilir.

Yukarıda bahsedilen üç önemli markör grubu dışında daha birçok markör grubu mevcut olup bunlar bitkiler dışında, özellikle mikroorganizmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak mitokondriyal DNA'lar, bazı ilaçlara karşı gösterilen direçlilik ve auxotrophic mutantlar sayılabilir.

İkinci bölümde incelenen markörler, tüm gelişmiş ıslah programlarında kullanım sahası bulmuştur. Bitki ıslahında, genetik mühendisliği tekniklerinden yararlanılarak farklı kaynaklardan gen aktarımı gibi çeşitli temel araştırmalar devam etmekte olup, bu araştırmalar kesin sonuç verdikten sonra uygulamalı araştırmalar yapan bitki ıslah enstitüleri de bu konularda çalışabilecektir. Bu alanda çalışan uzmanlarca genetik materyalin ustaca manipülasyonu klasik bitki ıslah tekniklerine çok önemli katkılarda bulunma potansiyeline sahiptir. Örneğin, rekombinant DNA (rDNA) teknolojisi ve protoplast füzyonu gibi çeşitli tekniklerin önümüzdeki yıllarda buğday ve diğer tahıllarda agronomik özellikleri bozmadan protein miktarı ile işleme ve besleme kalitesini yükseltmek amacıyla kullanılacağı ümit edilmektedir. Bu alandaki araştırmalardan bitki ıslahçıların önümüzdeki yıllarda yararlanabileceği son gelişmeler üçüncü bölümde özetlenmiştir.

3. GENETİK MÜHENDİSLİĞİ ve HUBUBAT İSLAHI

Genetik mühendisliği alanındaki gelişmeler, bir bitki genomuna genetik bilgi ilave etme ve daha sonra bitki doku ve hücre kültüründeki yenilikler yardımıyla gen aktarılan tek hücreden yeni bitkiler üretme imkanı ortaya çıkarmış bulunmaktadır. Protoplast (hücre duvarsız bitki hücresi) eldesi için geliştirilen yöntemler bitkilerin bu şekilde dönüştürülmesinde (transformasyon) önemli bir adımdır. Ayrıca restriksiyon enzimleri ile üretilen DNA parçalarının bakteriyel sistemler kullanılarak fonksiyonel DNA halinde klonlanabilmesi, dönüştürülmüş (transgenic) bitkilerin yaratılabilmesi için temel gereçleri sağlamıştır. Bu alandaki gelişmelerin en önemlisi ise doğada mevcut olan ve bitki hücrelerine kendi DNA'sını stabil olarak sokabilen bir bakterinin (Agrobacterium tumefaciens) kullanılması ile ortaya çıkmıştır (Jaworski, 1987). Agrobacterium tumefaciens tümör oluşturan (tumor inducing = Ti) bir plazmid içerir ki bunun doğal formu bitkilerde kök tacı tümörleri oluşturur. Ti plazmid DNA'sının küçük bir bölümünü (T-DNA) dönüştürülecek olan hücreye aktararak onun çekirdeğindeki DNA'ya stabil olarak katabilir. Araştırmacılar Agrobacterium'un bu özelliğini, genetik mühendisliği tekniklerinden yararlanarak Ti plazmidini yararlı bir vektöre dönüştürmekte kullanmışlardır. Bu uygulamada bitkiye aktarılmak istenen genin yanısıra, daha sonraki aşamalarda gen aktarılmış hücrelerin seçimini kolaylaştırmak için kanamycin veya diğer bir antibiyotige dayanıklılık sağlayan gen de birlikte söz konusu bakteriye aktarılır. Daha sonra elde edilen bakterilerle, dönüştürülmek istenen bitki enfekte edilerek yabancı gen bitki genomuna aktarılmaktadır. Bitki ıslahında yeni ufuklar açan bu uygulamalarla önemli bazı başarılar elde edilse de henüz emekleme aşamasında olup, temel araştırmalar şeklinde yürütülmektedir. Bu konudaki en büyük eksiklik bitkilerin biyokimyasal ve moleküler biyoloji düzeyindeki temel özelliklerinin yeteri kadar bilinmemesidir. Fakat bu alandaki gelişmeler bitki gen yapılarını, organizasyon ve fonksiyonlarını belirlemede; önemli bazı karakterlere ait genlerin saptanmasında, izole edilme-

sinde ve karakterizasyonunda; bu genlerin veya ürünlerinin markör olarak kullanılabilme imkanlarının araştırılmasında önemli katkıda bulunacaktır. A. tumefaciens ile yapılan bu çalışmaların ilk başarılı sonuçları dikotiledonlardan elde edilmiştir. Çünkü bu bitkiler Agrobacterium ile aşılınmaya duyarlıdır. Fakat son araştırmalar bu çalışmaların tahılların da dahil olduğu monokotiledonlarda da kullanılabilceği göstermiştir.

Ayrıca moleküler klonlama ve DNA teknikleri bitkilerin bünyesinde bulunan proteinlerin (örneğin buğday depo proteinleri, izoenzimler vb.) ve ilgili genlerin karakterizasyonunda kullanılabilir. Bu amaçla incelenmek istenen gene spesifik bir prob ve bu geni de içeren DNA parçacıklarından oluşan bir kütüphaneye ihtiyaç vardır. İncelenecek olan DNA parçası çeşitli yöntemlerle tesbit edildikten sonra alınıp daha ileri çalışmalarda kullanılmak için miktarını artırmak amacıyla bir plazmid vektörüne yerleştirilir. Klonlanan DNA bir buğday gliadin geni ise, gliadinler üzerindeki araştırmalarda protein kalitesi ile ekmeçlik kalitesi arasındaki ilişkileri incelemekte kullanılabilir (Hedgcoth, 1985).

Proteinlerin amino asit diziliminin belirlenmesinin oldukça güç ve zaman alıcı olmasına karşın DNA baz dizilimlerinin belirlenmesi daha kolaydır. Ayrıca baz dizilimine bakarak buna tekabül eden amino asit dizilimi de bulunabilir. Örneğin bazı gliadinlerin amino asit dizilim sırası kendilerini kodlayan genin baz dizilim sırası çıkartılarak belirlenmiştir (Rafiaski vd, 1984). Amino asit dizilimi gerek kodlayan genden, gerekse de proteinin kendisinden çıkarılsın bu primer yapıya bakılarak söz konusu proteinin mümkün olan sekonder ve tersiyer yapıları hakkında tahmin yürütülebilir. Örneğin bu bir gliadin proteini ise benzer bulgular diğer buğday proteinlerinin yapıları, hangi noktalardan inter-veya intra-moleküler disülfid bağlantısı yapabilecekleri gibi konularda fikir verecektir.

Bunların dışında, bir gen üzerinde mRNA sentezi veya herhangi bir protein sentezinin, bitki gelişiminin uygun bir devresinde yapılmasını sağlayacak sinyal dizilimlerinin bulunması

ve karakterizasyonu klonlanan genlerin *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarında yararlı olacaktır. Spesifik bir protein örneğin bir gluten proteini hakkındaki bilinmeyenler bu proteini kompleks bir karışımdan purifiye etmek yerine tek başına üretmek suretiyle daha kolay çözümlenir. Buğday tanesindeki gliadin kompleksi içinde 40-100 tip farklı gliadin olduğu tahmin edilmekte olup bunlar birçok özellikler bakımından benzerlik gösterirler (alkolde çözünürlük vb.). Bu nedenle karışımdan saf olarak elde edilmeleri güçtür. Tek bir tipteki gliadin, ilgili geni bir vektör vasıtasıyla bakteri veya maya bünyesine sokup sonra bunların besi ortamında çoğaltılması ile saf olarak üretilebilir. Bu yaklaşımla bir takım amino asitleri mutasyonla çıkarılmış veya değiştirilmiş sproteinler

de çoğaltılabilir. Değiştirilen bu proteinler ise değişimin yapı ve teknolojik özellikler üzerindeki etkisini incelemek amacıyla kullanılabilir. Örneğin bazı gluten proteinlerinin amino asit dizilim sıraları biliniyorsa bunların ekmeklik kalitesini bozmadan esansiyel amino asitlerden lisinin proteine hangi noktada sokulabileceği tahmin edilebilir. Doğal haldeki veya modifiye edilmiş tek tipteki gluten proteinleri klonlanarak mikroorganizmalarda üretilip izole edildikten sonra ekmeklik kalitesine etkisi incelenebilir. Önümüzdeki yıllarda temel ve uygulamalı araştırmaların sonuçlarına dayanarak bu proteinlerin daha iyi formları tasarlanıp, bunların genleri tekrar tetraploid veya heksaploid buğdayların bünyesine verilebilecektir.

L İ T E R A T Ü R

- BECKMANN, J.S., SOLLER, M. 1986. Restriction fragment length polymorphism and genetic improvement of agricultural species. *Euphytica* 35: 111-124.
- BIETZ, J.A. 1983. Separation of cereal proteins by RP-HPLC. *J. Chromatography* 255: 219-238.
- BIETZ, J.A. 1987. Genetic and biochemical studies of nonenymic endosperm proteins. In: *Wheat and Wheat Improvement*. Ed. E.G. Hayne. ASA Inc, CSSA Inc, SSSA Inc Publishers Madison, Wisconsin, USA.
- BURNOUF, T. ve BIETZ, J.A. 1984. Reversed-phase high performance liquid chromatography of reduced glutenin, a disulfide-bonded protein of wheat endosperm. *J. Chromatography* 299: 185-199.
- BUSHUK, W ve ZILMANN, R. 1978. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. I. Apparatus, method, and nomenclature. *Can. J. Plant Sci.* 58: 505-515.
- DAMIDAUX, R., AUTRAN, J.C., GRIGNAC, P. ve FÉLLET, P. 1978. Mise en évidence de relations applicables en sélection entre I électrophoregramme des gliadines et les propriétés viscoélastiques du gluten de *Triticum durum* C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D 287: 701-709.
- DAUSSANT, J. ve SKAKOUN, A. 1983. Immunochemistry of seed proteins. p. 101-133. In: *Seed Proteins* Eds. Daussant vd. Academic Press, London.
- FULLINGTON, J.G. COLE, G.N. ve KASARDA, DD. 1980. Quantitative SDS-PAGE of total protein from different wheat varieties. *J. Sci. Food Agric.* 31: 43-53.
- HEDGCOTH, C. 1985. Why clone wheat storage protein genes. *Cereal Foods World* 30 (11): 781-783.
- JAWORSKI, E.G. 1987. The impact of biotechnology on food production. *Cereal Foods World* 30: 781-783.

- LANDRY, B.S., MICHELMORE, R.W. 1987. Methods and applications of RFLP analysis to plants. In: Tailoring Genes for Crop Improvement: An agricultural Perspective. Ed. G. Bruening, T. Kosuge, J. Haroda. A. Hollaender. p. 25 - 44. Plenum Press.
- PAYNE, P.I., HOLT, L.M. ve BLACKMAN, J. A. 1981. Correlation between the inheritance of certain high-molecular-weight subunits of glutenin and bread-making quality in progenies of six crosses of bread wheat. J. Sci. Food Agric. 32: 51 - 60.
- PAYNE, P.I., ZACKSON, E.A. ve LAW, C.N. 1984. Wheat storage proteins: Their genetics and their potential for manipulation by plant breeding. Philos. Trans. R. Soc. Lon. Ser. B. 304: 359 - 371.
- RAFALSKI, J.A., SCHEETS, K., METZLER, M. PETERSON, D.M. HEDGCOTH, C. ve SOLL, D.G. 1984. Developmentally regulated genes: The nucleotide sequence of a wheat gliadin genomic clone. EMBO, J. 3: 1409.
- WRIGLEY, C.W., AUTRAN, J. ve BUSHUK, W. 1982. Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of grain proteins. Adv. Cereal Sci. Tech. 5: 211 - 259.
- WU, L., HARIVANDI, A.H., HARDING, J.A. ve DAVIS, W.B. 1984. Identification of Kentucky bluegrass with esterase and phosphoglucanase isoenzyme markers Crop Sci. 29: 763 - 768.