

**EKMEKLİK BUĞDAYDA (*TRITICUM AESTIVUM* L.)
LİNE TESTER MELEZLERİNDE
KAHVERENGİ PASA DAYANIKLILIĞIN
MORFOLOJİK KARAKTERİZASYONU**

Belgin Ümmü İNKAYA
Yüksek Lisans Tezi
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı
DANIŞMAN: Prof. Dr. İsmet BAŞER

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**EKMEKLİK BUĞDAYDA (*Triticum aestivum* L.) LİNE TESTER MELEZLERİNDE
KAHVERENGİ PASA DAYANIKLILIĞIN MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Belgin Ümmü İNKAYA

TARLA BİTKİLERİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. İSMET BAŞER

TEKİRDAĞ-2019

Her Hakkı Saklıdır

Prof. Dr. İsmet BAŞER danışmanlığında, Belgin Ümmü İNKAYA tarafından hazırlanan “Ekmeklik Buğdayda (*Triticum aestivum* L.) Line Tester Melezlerinde Kahverengi Pasa Dayanıklılığın Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonu” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tarla Bitkileri Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul/red edilmiştir.

Juri Başkanı : Prof. Dr. Z. Kayıhan KORKUT

Üye : Prof. Dr. İsmet BAŞER (Danışman)

Üye : Prof. Dr. Mevlüt AKÇURA

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Doç. Dr. Bahar UYMAZ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren bilgi, deneyim ve desteğini benden esirgemeyen, çalışmamın planlanması, yürütülmesi ve hazırlanması aşamalarında büyük yardımlarını gördüğüm değerli Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. İsmet BAŞER' e, çalışmamın her aşamasında yardımcı olan değerli hocalarım Prof. Dr. Oğuz BİLGİN ve Dr. Öğr. Üyesi Alpay BALKAN' a ve çalışmam boyunca yardımcı olan arkadaşım Ziraat Mühendisi Mustafa CERİT' e içten teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca büyük destek ve fedakârlıkları gösteren babam Türkay İNKAYA, annem Hatice İNKAYA ve kardeşlerim Yalçın İNKAYA ve Berna İNKAYA' ya, çalışma süresince bana destek olan Yusuf KOPARAN' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

EKMEKLİK BUĞDAYDA (*Triticum aestivum* L.) LİNE TESTER MELEZLERİNDE KAHVERENGİ PASA DAYANIKLILIĞIN MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Belgin Ümmü İNKAYA

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İsmet BAŞER

Araştırma, 2016-2017 yetiştirme döneminde Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Deneme Alanı'nda tesadüf blokları deneme desenine göre yürütülmüştür. 2016 yılında ekimi yapılan Pehlivan, Sana, Tina, Tekirdağ, Gelibolu, Nina, Flamura-85, Saban, Kate A-1 buğday genotiplerine *Lr 9*, *Lr 14*, *Lr 19*, *Lr 22*, *Lr 24*, *Lr 34* kahverengi pas dayanıklılık genlerini içeren izogenik hatlardan baba olarak kullanılarak melezleme yapılmıştır. Araştırmada ekmeklik buğday genotipleri, *Lr* genleri içeren izogenik hatlar ve bunların melezlenmesi sonucu elde edilen F₂ populasyonları deneme alanına her genotip için 2 sıra olmak üzere 5 metrelik sıralara 3 tekrarlamalı olarak ekilmiştir. Ekim sırasında denemenin başına, sonuna ve her 10 sırada bir olmak üzere kahverengi pasa hassas olan Morocco genotipi ekilmiştir. Deneme alanındaki bitkilerde hastalık değerlendirmeleri 2 dönemde (erken - geç) Modifiye edilmiş Cobb skalası (Peterson et al. 1948) baz alınarak yapılmıştır. Tarla koşullarında yapılan hastalık okumalarına göre ekmeklik buğday çeşitleri ve *Lr 9* ve *Lr 24* izogenik hatları arasındaki tüm melez kombinasyonlarının kahverengi pasa dayanıklılık özelliği gösterdiği belirlenmiştir. Buna karşın bu üç ekmeklik buğday çeşidi ile *Lr 14*, *Lr 19*, *Lr 22* ve *Lr 34* dayanıklılık genlerini taşıyan izogenik hatlar arasında yapılan melez döller ise kahverengi pasa karşı hassas özellik göstermiştir.

Flamura-85, Pehlivan, Saban ekmeklik buğday genotipleri ve 6 farklı kahverengi pasa dayanıklılık geni taşıyan izogenik hatlar arasındaki melez populasyonlarda yapılan SSR analiz sonuçlarına göre *Lr 9* ve *Lr 19* genini tüm bireylerin taşıdığı belirlenmiştir. *Lr 22* geninin ise F₂ bitkilerinde farklı oranlarda aktarıldığı belirlenmiştir. *Lr 24* geni ise Flamura çeşidi ile yapılan melezlerin tümünde, Saban melezlerinde ise % 33 oranında aktarılmıştır. *Lr 34* geni melez populasyonlarda ise melezlenen buğday genotipine göre farklı oranlarda bulunmuştur.

Elde edilen veriler Trakya Bölgesi için özellikle *Lr 9* ve *Lr 24* dayanıklılık geninin önemli seleksiyon kriteri olduğunu göstermektedir. Ekmeklik buğday çeşitleri ile *Lr 22* geni bulunan izogenik hat arasındaki melez kombinasyonlarda *Lr 22* geninin bulunmaması bu gen yönünden daha ayrıntılı çalışmalar yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Yapılan melez populasyonlarda *Lr 14*, *Lr 19* ve *Lr 34* kahverengi pasa dayanıklılık genleri bulunmasına rağmen yüksek oranda hastalık oluşması Trakya Bölgesi'nde hastalık ırkları yönünden önem taşımadığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Ekmeklik buğday, kahverengi pas, *Lr* geni, izogenik hat, populasyon

ABSTRACT

MSc. Thesis

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF LEAF RUST RESISTANCE IN BREAD WHEAT (TRITICUM AESTIVUM L.)

LINE TESTER HYBRIDS

Belgin Ümmü İNKAYA

Tekirdağ Namık Kemal University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Field Crops

Supervisor: Prof. Dr. İsmet BAŞER

The research was carried out according to the randomized block trial design in the Field Crops Experimental Area of the Faculty of Agriculture of Namık Kemal University in 2016-2017 cultivation period. Pehlivan, Sana, Tina, Tekirdağ, Gallipoli, Nina, F-85, Saban, Kate A-1 bread wheat varieties and brown rust resistance genes *Lr 9*, *Lr 14*, *Lr 19*, *Lr 22*, *Lr 24*, *Lr 34* (father) isogenic lines crossed. In this study, F₂ populations obtained as a result of cross-breeding wheat genotypes and isogenic lines containing *Lr* genes were planted in 5-row rows with 3 replications for each genotype. In the planting of F₂ plants, Morocco genotype, which is sensitive to brown rust, was planted in every 10th order. Disease evaluations in the plants in the trial area were done in 2 periods (early and late) based on the modified Cobb scale (Peterson et al. 1948).

It was determined that all hybrid combinations between bread wheat varieties and isogenic lines with *Lr 9* and *Lr 24* genes showed leaf rust resistance according to the disease readings in field conditions. On the other hand, hybrid progenies between bread wheat varieties and isogenic lines carrying *Lr 14*, *Lr 19*, *Lr 22* and *Lr 34* showed sensitive to leaf rust.

According to the results of SSR analysis performed in the hybrid populations between three bread wheat genotypes and the isogenic line carrying 6 different brown rust resistance genes, it was determined that all F₂ progenies carried *Lr 9*, *Lr 19* genes. The *Lr 22* gene was found at different rates in F₂ plants of the hybrid combinations. The *Lr 24* brown rust gene was transferred to all of the hybrid offspring made with the Flamura cultivar, while this ratio was 33% in the Saban hybrids. The *Lr 34* gene was found to be different in the hybrid populations compared to the hybridized wheat genotype.

The data obtained indicate that *Lr 9* and *Lr 24* leaf rust resistance genes are important selection criteria for Thrace region. The lack of the *Lr 22* gene in the hybrid combinations between the bread wheat varieties and the isogenic line with the *Lr 22* gene showed that more detailed studies should be carried out for this gene. Although the transfer of *Lr 14*, *Lr 19*, and *Lr 34* brown rust resistance genes in hybrid populations, high rates of disease in F₂ plants of these combinations indicate that these genes are not important in terms of disease races in Thrace region.

Keywords : Bread wheat, leaf rust, *Lr* gene, isogenic line, population

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGE DİZİNİ	iv
ŞEKİL DİZİNİ	v
KISALTMALAR	vi
1.GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	8
3. MATERYAL ve YÖNTEM	13
3.1. Materyal	13
3.2. Araştırma Yerinin Özellikleri	14
3.2.1. Toprak Özellikleri.....	14
3.2.2. İklim Özellikleri	15
3.3. Yöntem	15
3.3.1. Morfolojik Tanımlama	17
3.3.2. Moleküler Karakterizasyon	19
3.3.2.1. Sterilizasyon.....	19
3.3.2.2. DNA İzolasyonu	19
3.3.2.3. DNA Konsantrasyonu ve Safliklarının Belirlenmesi.....	19
3.3.2.4. PCR Uygulaması.....	22
3.3.2.5. Elektroforesis	25
3.3.2.5.1. Tris- Borik Asit – EDTA (TBE) Çözeltilisinin Hazırlanması.....	25
3.3.2.5.2. Agaroz Jelin Hazırlanması ve PCR Ürünlerinin Agaroz Jele Yüklenmesi.....	26
4.BULGULAR ve TARTIŞMA	28
4.1. Doğal Koşullar Altında Kahverengi Pasa Dayanıklılık	28
4.2. Moleküler Analizler	30
4.2.1. <i>Lr 9</i> Geni İçin Elde Edilen SSR Sonuçları.....	30
4.2.2. <i>Lr 14</i> Geni İçin Elde Edilen SSR Sonuçları.....	32
4.2.3. <i>Lr 19</i> Geni İçin Elde Edilen SSR Sonuçları.....	34
4.2.4. <i>Lr 22</i> Geni İçin Elde Edilen SSR Sonuçları	36
4.2.5. <i>Lr 24</i> Geni İçin Elde Edilen SSR Sonuçları.....	38
4.2.6. <i>Lr 34</i> Geni İçin Elde Edilen SSR Sonuçları.....	39
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	42
6.KAYNAKLAR	44

ÇİZELGE DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1 : Araştırmada Kullanılan Melezler.....	13
Çizelge 3.2 : Deneme Alanına Ait Toprak Analiz Sonuçları.....	14
Çizelge 3.3 : 2017/2018 Döneminde Deneme Yerine Ait İklim Değerleri.....	15
Çizelge 3.4 : Pas Hastalık Şiddeti ve Enfeksiyon Tipinin Belirlenmesinde Kullanılan Modifiye Edilmiş Cobb Skalası.....	18
Çizelge 3.5 : DNA Ekstaksiyon Solusyonu Bileşenleri.....	20
Çizelge 3.6 : Çalışmada Kullanılan <i>Lr</i> Genleri, SSR Primerleri ve Baz Dizilimleri.....	23
Çizelge 3.7 : PCR Yükleme Tampon Çözeltisi Bileşenleri.....	24
Çizelge 3.8 : 10X TBE Tampon Çözeltisinin Hazırlanması İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Miktarları.....	26
Çizelge 4.1 : Ekmeklik Buğday Genotiplerinde Hastalık Okumaları Sonucu Dayanıklılık Değerleri.....	28

ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1 : Yaprak Yüzeyinde Kahverengi Pas Püstüllerinin Görünümü.....	3
Şekil 1.2 : Kahverengi Pas Fungusunun Yaşam Çemberi.....	4
Şekil 3.1 : Melezleme İşlemi Uygulanan Başak.....	16
Şekil 3.2 : Pas Şiddetinin Belirlenmesinde Kullanılan Modifiye Edilmiş Cobb Skalasının Şematik Gösterimi.....	17
Şekil 3.3 : Buğdayda Kahverengi Pas Hastalığının Değerlendirilmesi.....	18
Şekil 3.4 : Özütleme Tamponu Eklenecek Parçalanmış Yaprak Örnekleri.....	20
Şekil 3.5 : Örneklerin 65 °C’ de İnkübasyon Yapılması.....	21
Şekil 3.6 : Santrifuj Yapılan Örneklerde Üst Fazın Ayrımı.....	21
Şekil 3.7 : Soğuk Ethanol İçerisinde Yoğunlaşmış DNA Molekülleri.....	22
Şekil 3.8 : DNA Miktarının Belirlenmesinde Kullanılan Spektrofotometre Cihazı.....	23
Şekil 3.9 : Hazırlanan DNA Örneklerinin PCR Uygulaması.....	25
Şekil 3.10 : PCR Ürünlerinin Yürütüldüğü Elektroforez Cihazı.....	27
Şekil 4.1 : Flamura-85/ <i>Lr 9</i> F ₂ hattına ait <i>Lr 9</i> geni için SSR sonuçları.....	31
Şekil 4.2 : Pehlivan/ <i>Lr 9</i> F ₂ hattına ait <i>Lr 9</i> geni için SSR sonuçları.....	31
Şekil 4.3 : Saban/ <i>Lr 9</i> F ₂ hattına ait <i>Lr 9</i> geni için SSR sonuçları.....	32
Şekil 4.4 : Flamura-85/ <i>Lr 14</i> F ₂ hattına ait <i>Lr 14</i> geni için SSR sonuçları.....	33
Şekil 4.5 : Pehlivan/ <i>Lr 14</i> F ₂ hattına ait <i>Lr 14</i> geni için SSR sonuçları.....	33
Şekil 4.6 : Saban/ <i>Lr 14</i> F ₂ hattına ait <i>Lr 14</i> geni için SSR sonuçları.....	34
Şekil 4.7 : Flamura-85/ <i>Lr 19</i> F ₂ hattına ait <i>Lr 19</i> geni için SSR sonuçları	35
Şekil 4.8 : Pehlivan/ <i>Lr 19</i> F ₂ hattına ait <i>Lr 19</i> geni için SSR sonuçları.....	35
Şekil 4.9 : Saban/ <i>Lr 19</i> F ₂ hattına ait <i>Lr 19</i> geni için SSR sonuçları.....	36
Şekil 4.10 : Flamura-85/ <i>Lr 22</i> F ₂ hattına ait <i>Lr 22</i> geni için SSR sonuçları	37
Şekil 4.11 : Saban/ <i>Lr 22</i> F ₂ hattına ait <i>Lr 22</i> geni için SSR sonuçları.....	37
Şekil 4.12 : Flamura-85/ <i>Lr 24</i> F ₂ hattına ait <i>Lr 24</i> geni için SSR sonuçları	38
Şekil 4.13 : Saban/ <i>Lr 24</i> F ₂ hattına ait <i>Lr 24</i> geni için SSR sonuçları.....	39
Şekil 4.14 : Flamura-85/ <i>Lr 34</i> F ₂ hattına ait <i>Lr 34</i> geni için SSR sonuçları	40
Şekil 4.15 : Pehlivan/ <i>Lr 34</i> F ₂ hattına ait <i>Lr 34</i> geni için SSR sonuçları.....	40
Şekil 4.16 : Saban/ <i>Lr 34</i> F ₂ hattına ait <i>Lr 34</i> geni için SSR sonuçları.....	41

KISALTMALAR

bP : Base pair- baz çifti

CIMMYT : International Maize and Wheat Improvement Center

CTAB : Hexadecyltrimethylammonium bromide

DNA : Deoxyribonucleic acid

dNTP : Dinucleotide triphosphate

Lr : Leaf rust

mM : Milimolar

MR : Moderately Resistant

MS : Moderately Susceptible

PCR : Polymerase Chain Reaction

R : Resistant

S : Susceptible

SSR : Simple Sequence repeat

TBE : Tris- Borikasıit- EDTA

TE : Tris-EDTA

TÜİK : Türkiye İstatistik Kurumu

µl : Mikrolitre

1. GİRİŞ

Buğday dünyada insan beslenmesinde kullanılan kültür bitkileri arasında ekiliş ve üretim bakımından ilk sırada yer almaktadır, tarımı yapılan en önemli temel besin maddesidir ve insan beslenmesinde kullanılan tahıl ürünlerinin başında yer almaktadır. Dünya üzerinde geniş adaptasyon yeteneğine sahip olması, makinalı tarıma uygun olması, taşıma, depolama ve işlemedeki kolaylıklar, yem endüstrisinde kullanımı ve besin değeri göz önüne alınarak insan beslenmesinde kullanımı gibi faktörler dünyada geniş alanda yetiştiriciliğinin yapılmasına neden olmuştur.

Buğday tanesinde fermantasyon sırasında oluşan CO₂'i hamur içerisinde tutarak hamurun kabarmasına neden olan bir çeşit elastik protein formu gluten bulunmaktadır ve glutenin bu özelliğinden dolayı buğday ekmek yapımında kullanılmaktadır. Bunun yanında diğer unlu gıdaların imalatında, bulgur, makarna, irmik gibi çok değişik ürünler şekliyle beslenmemizde yer almaktadır. Öğütme teknolojisi sonucunda ortaya çıkan kepek ve diğer yan ürünler ile düşük kaliteli buğdaylar ise hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca buğday mineral maddeler, B vitamini ve diğer mikro besin maddelerince oldukça zengin olmakla birlikte insanların ihtiyaç duydukları gıda kalorisinin %20'sini karşılamaktadır. Bu kadar çok kullanım alanına sahip olması nedeniyle Türkiye'de buğday ve buğdaydan elde edilen gıda maddelerinin tüketimi ilk sıralarda yer almaktadır.

Uluslararası Hububat Konseyi (IGC) verilerine göre dünyada 219 milyon ha alanda 758 milyon ton buğday üretimi gerçekleşmiştir. AB (28) 151 milyon ton ile buğday üretiminde ilk sırada yer alırken bunu 129,8 milyon ton ile Çin ve 98,5 milyon ton ile Hindistan takip etmektedir. Dünya buğday üretiminde en fazla paya sahip olan ülkeler sırasıyla AB (28), Çin, Hindistan, Rusya, ABD, Kanada, Ukrayna, Pakistan, Türkiye, Avustralya' dır (TMO 2018).

Ülkemizde buğday ekim alanı 72 milyon 992 bin dekar, üretim miktarı ise 20 milyon tondur. Ülkemizde ekmeklik buğday üretiminde İç Anadolu Bölgesi %32'lik pay ile ilk sırada yer almaktadır. Bunu %18 ile Marmara Bölgesi ve %15 ile Güneydoğu Anadolu Bölgesi izlemektedir. Üretimde en az olduğu bölgeler Doğu Anadolu ve Ege Bölgeleridir. En fazla buğday üretimine sahip 10 il ise sırasıyla Konya, Ankara, Diyarbakır, Şanlıurfa, Yozgat, Tekirdağ, Sivas, Mardin, Eskişehir, Edirne'dir (TUİK,2018).

Buğday yetiştiriciliğinde karşılaşılan en önemli sorunları biyotik ve abiyotik stres koşulları oluşturmaktadır. Bitkiler biyotik ve abiyotik stres koşullarından önemli derecede etkilenmektedir. Bitkilerin bu stres faktörlerine maruz kalmaları onların genetik potansiyellerine ulaşmalarını engeller, büyüme ve gelişmelerini olumsuz yönde etkiler ve ürün kalitesi ile verimliliklerini sınırlandırır. Abiyotik stres koşullarını bitki besin elementleri, tuz, pestisit ve toksinlerden kaynaklanan elverişsiz toprak koşulları, kuraklık, sıcaklık, rüzgar, kar ve buz gibi uygun olmayan iklim koşulları ile radyasyon ve hava kirliliği oluşturmaktadır. Biyotik stres koşulları ise zararlılar (böcekler, mikroorganizmalar, virüsler, bakteriler, mantarlar), yabancı otlar ve hastalıklardır. Bitkisel üretim sonucu elde edilen tarımsal ürünlerin belirli bir kısmında hastalıklar nedeniyle kayıplar oluşmaktadır. Bitki hastalıklarının oluşturduğu ürün kayıplarını ortadan kaldırmak için farklı yöntemler kullanılmaktadır fakat oluşan ürün kayıpları yüksek miktarlardadır. Hastalıkların oluşturduğu ürün kayıplarının dünyadaki toplam ürünün %12' si olduğu tahmin edilmektedir.

Buğdayda görülen hastalıklar arasında paslar dünyada bilinen en eski ve en fazla zarar veren hastalıklar arasındadır. Paslar dünya çapında tahıllarda en yaygın görülen ve ekonomik yönden büyük zarar gösteren önemli hastalıklar arasında yer almaktadır (Roelfs ve ark., 1992). Buğday pas hastalıkları tehlikeli patojenlerdir ve verim ve kalitede önemli kayıplara neden olan fungal hastalıklardandır, hastalık gelişimi için uygun ortam oluştuğunda ciddi tahribata yol açarak buğday üretiminde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Dünya çapında birçok buğday üretim alanı hastalık gelişimi için elverişli ortamlardır ve ciddi verim kayıplarına eğilimlidir. Oluşabilecek verim kayıpları hastalığın şiddetine bağlı ve buğday genotipinin hastalığına olan hassasiyetine göre farklılık göstermektedir. Buğdayda pas hastalığından doğan zarar iklim şartlarına göre değişir ve belirli periyotlarda epidemi yaparak büyük zararlara neden olabilmektedir. Ürün kaybı çeşitlerin duyarlılıklarına, çevre koşullarına, etmenlerin ırklarına göre değişmektedir. Bunun yanında yıldan yıla, bölgeden bölgeye bağlı olarak ürün kaybında farklılıklar da görülmektedir.

Buğday üzerinde kara pas, sarı pas ve kahverengi pas olmak üzere üç farklı pas hastalığı görülmektedir. Bu üç farklı hastalığa karşı her biri için pas fungusunun özel türleri sebep olmaktadır. Kara pası *Puccinia graminis Pers. f. sp. tritici Eriks. and E. Henn*, sarı pası *Puccinia striiformis Westendorp f. sp. tritici Eriks*, kahverengi pası ise *Puccinia triticina Eriks* enfekte etmektedir (Marsalis and Goldberg, 2006). Bu pas türleri arasında kahverengi pas ve sarı pas %60, kara pas ise %100 verim kayıplarına neden olabilmektedir (Park, 2007).

Ekmeklik buğdayda kahverengi pas neredeyse buğday yetiştirilen her yerde bulunur ve buğdayda bulunan diğer pas türlerine göre daha düzenli olarak görülmektedir (Chester, 1946). Kahverengi pas fungusu farklı iklimlere adapte olmuştur ve dünyada buğday yetiştirilen farklı alanlarda bulunabilir (Roelfs ve ark., 1992). Kahverengi pas ülkemizde ise başta Trakya olmak üzere Ege, Marmara, Karadeniz gibi bütün sahil bölgeleri ile geçit bölgeleri ve Orta Anadolu'da özellikle sulanır alanlarda etkili olmaktadır (Altay, 1980). Kahverengi pas, buğday yetiştirilen hemen her yerde görülmektedir fakat oluşturduğu zarar diğer pas türlerinin meydana getirdiği zarar kadar dikkat çekici olmamaktadır. Kara pas ve sarı pas her yıl etkili olmayıp 7-8 yılda bir ağır epidemiy meydana getirmektedir, kahverengi pas ise hemen her sene ortaya çıkmakta ve belli bir oranda verim kaybına neden olmaktadır (Altay, 1980).

Kahverengi pas genellikle buğday bitkisinin yapraklarında görülmektedir ve bu özelliğinden dolayı kahverengi pas yaprak pası olarak da bilinmektedir. Hastalığın ilk aşamasında yaprağın yüzeyinde küçük, elipse yakın yuvarlak benekler görülmektedir, hastalığın ilerleyen aşamasında bu benekler portakal rengi püstüllere dönüşmektedir ve püstüllerin etrafı bir hale ile çevrilmiştir. Hastalığın daha sonraki aşamalarında ise siyah sporlar oluşmaktadır. Buğday yetiştirilen alanlarda yüksek nem ve hava sıcaklığının 10-15 °C olduğu koşullarda ve kahverengi pas fungusunun yayılımı hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir.

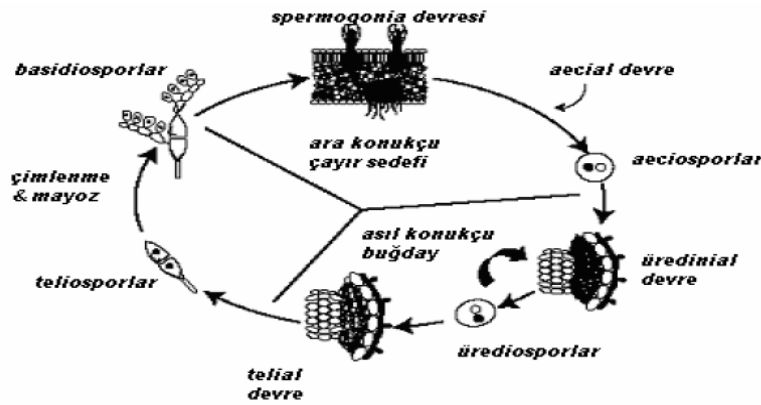


Şekil 1.1. Yaprak yüzeyinde kahverengi pas püstüllerinin görünümü (Salgado ve ark, 2016)

Kahverengi pas genellikle bitki yapraklarında oluşan pas püstülleri ile yaprak fotosentez alanını kısıtlayarak ürün kayıpları meydana getirmektedir. Pas püstülleri fotosentez alanını sınırlandırarak taneye taşınan besin maddesi miktarını azaltmaktadır ve taneye yetirince besin

maddesi dolmaması nedeniyle oluşan buğday tanelerinde 1000 tane ağırlığı, hektolitre ağırlığı azalmaktadır. Hastalığın oluşturduğu ürün kayıpları yalnızca tane verimi ile sınırlı kalmayıp aynı zamanda elde edilen tanenin protein içeriğini de azaltarak ürünün kalitesini de olumsuz yönde etkilemektedir. Çiçeklenme öncesi veya süresince meydana gelen salgınlar ve özellikle de bayrak yaprağı şiddetli bir enfeksiyona uğradığı zaman ciddi kayıplar oluşmaktadır (Lipps 2006). Kahverengi pasa karşı hassas olan buğday çeşitlerinde ilk pas enfeksiyonu görüldüğünde bitkinin gelişme aşamasına bağlı olarak %5-15 oranında veya daha fazla oranda verim kaybı meydana gelmektedir (Chester1946, Joshi ve Palmer1973).

Pas fungusunun yaşam döngüsü beş farklı devreden oluşmaktadır. Spermogonia devresinde üreme organları oluşarak pas fungusunun eşey hücreleri meydana gelmektedir. Aecia devresinde aeciosporlar oluşmaktadır ve bu sporlar etrafındaki zarın patlaması sonucu doğaya yayılırlar. Üredia devresinde üredosporlar oluşmaktadır ve bu sporlar pas fungusunun salgın oluşmasında etkilidirler. Üredosporlar ilkbahardan yaz sonuna kadar çoğalarak enfeksiyona neden olmaktadır. Yaşam çemberinde ara konukçu olarak çayır sedefi (*Tbalictrum spp.*) yer almaktadır. Sonbaharda teliosporlar meydana gelmektedir, teliosporlar çimlenerek basidim oluşturmaktadır. Basidim içinde mayoz ve mitoz bölünmeler sonucu 4 adet çekirdek oluşmaktadır ve bunlar doğaya yayılarak ana konukçu olan buğdayı enfekte etmektedir. Pas fungusunun yaşam çemberi Şekil 1.2' de gösterilmiştir. (Nemli, 2000).



Şekil 1.2. Kahverengi pas fungusunun yaşam döngüsü (Marsalis ve Goldberg, 2006).

Bitki ıslahı; mevcut varyasyonlardan uygun seleksiyon yöntemleri kullanılarak yeni genotiplerin geliştirilmesini sağlamaktır. Buğday ıslah çalışmalarının temel amacı birim alandan elde edilen tane verimini artırmak, protein oranı yüksek ve yüksek kaliteye sahip, yatmaya dayanıklı, biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dayanıklı yeni genotiplerin

oluşturulmasına dayanmaktadır. Trakya Bölgesi' nde ekmeçlik buğdayda biyotik stres faktörleri ve bu biyotik stres faktörler içerisinde ise kahverengi pas yüksek düzeyde ürün kayıplarına neden olmaktadır. Kahverengi pas nedeniyle oluşan ürün kayıpları hastalığın şiddeti veya enfeksiyon tipi ve buğday genotipinin dayanıklılık genleri ile pas hastalık etmeninin saldırgan genleri arasındaki interaksiyon ile belirlenmektedir.

Kahverengi pas fungusunun birçok ırkı mevcuttur ve çeşitler bütün ırklara dayanıklı değildir. Her birkaç yılda bir yeni ırklar meydana gelmekte ve daha önceki dayanıklı çeşitler duyarlı hale gelmektedirler. Kahverengi pasa dayanıklı bir çeşidin dayanıklılık süresi genellikle 2 ile 4 yıl arasında değişmektedir. Buğday ıslah programları yeni dayanıklılık genlerinin yeni çeşitlere aktarılmasıyla sürdürülmelidir (Lipps, 2006). Hızla gelişen patojen popülasyonu ile başa çıkabilmek için yeni dayanıklılık genlerinin sürekli araştırılması gerekmektedir. Bugüne kadar buğday ve ilgili türlerde 71 kahverengi pas dayanıklılık geni tanımlanmıştır (McIntosh ve ark., 2012).

Kahverengi pasa dayanıklılığı arttırmak için iki temel ıslah stratejisi vardır; bunlardan birincisi tam dayanıklılık sağlayan büyük dayanıklılık genlerinin (*Lr* genleri) piramidleştirilmesi, ikincisi ise kantitatif dayanıklılık gösteren küçük genlerin bir araya getirilmesidir. Ancak tek bir gen tarafından sağlanan dayanıklılık çok kısa zaman periyotlarında patojen popülasyonunda virulent ırkların ortaya çıkmasıyla yok olmaktadır. Daha uzun süreli dayanıklılığı elde etmek için kısmi dayanıklılık veya yavaş paslanma dayanıklılığı (slow rusting resistance) olarak adlandırılan kantitatif dayanıklılık tercih edilmelidir. Çünkü kantitatif dayanıklılıkta pas enfeksiyonu tamamen engellenmez sadece hastalığın yayılması önlenir (Messmer ve ark., 2000).

Bitki ıslahı çalışmalarında ihtiyaç duyulan varyasyon yerel çeşitler, yabancı türler, türler arası melez ve tescil edilmiş yeni çeşitlerden oluşturulmaktadır. Islah amacına uygun olan genlerin bu materyallerden uygun ıslah yöntemleri kullanılarak çeşitlere aktarılması gerekmektedir. Bitki ıslahında başarı öncelikle etkin, doğru ve hızlı bir seleksiyona bağlıdır (Frankel, 1972). Klasik bitki ıslahında birtakım problemler ile karşılaşmaktadır ve markör destekli seleksiyon klasik bitki ıslahında karşılaşılan bu sorunlara alternatif olarak geliştirilmiştir (Francia, 2004). Klasik ıslaha kıyasla, moleküler markörlerin kullanımı geri melez ıslahının etkinliğini ve güvenilirliğini artırmaktadır (Francia ve ark., 2005). Markör destekli seleksiyon ile tahıllarda verim, kalite, hastalık ve zararlılara dayanıklılık gibi

konularda yapılan çalışmalar giderek artmakta ve başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Özellikle buğdayda uzun yıllar sürecektir olan ıslah çalışmaları çok kısa sürede tamamlanarak sarı pas, kahverengi pas ve külleme gibi önemli hastalıklara dayanıklılık genlerinin yeni çeşitlere aktarımı sağlanmıştır (Sönmezoğlu ve ark., 2010; Yıldırım ve ark., 2004; Kolmer 1996, Huang ve ark., 2003),

Bitki ıslahında kullanılan markörler morfolojik markörler, biyokimyasal markörler ve moleküler markörler olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Bunlar arasında en çok kullanılan ise moleküler markörlerdir. Moleküler markörler, farklılığı DNA düzeyinde ölçen ve araştırılan genotiplerde istenen bir geni ya da özelliği izlemek için kullanılabilen markörlerdir. Moleküler markörlerin bitki ıslahında kullanımı; genotipik tanımlama, çeşit tescili, tohum saflık testleri, genom dizi haritalarının oluşturulması, ıslah hatlarının tanımlanması, genetik çeşitliliğin belirlenmesi, adaptasyon yeteneğinin belirlenmesi, gen kaynaklarının genetik kökeninin belirlenmesi şeklinde sıralanabilir. Moleküler markörler çevresel faktörlerden etkilenmediği için güvenilirliğinin yüksek olması, fenotipik taramaya göre daha kolay olması, tahıl ve diğer bitkilerin ıslah çalışmalarında uygulanabilir olması ve ıslah çalışmalarına hız kazandırması, genetik kaynakların tanımlanması, çeşit karışıklığının ayrılması gibi avantajlar sağlamaktadır.

Moleküler markörlerin morfolojik ve biyokimyasal markörlere göre avantajı ise; genomla bağlı olduklarından güvenilir olması, tekrarlanabilir olması, genomda birden fazla bölgeyi belirleme imkanına sahip olması, çevre koşullarından etkilenmemesi, dominant ve kodominant özellik göstermeleri ve bütün dokularda tanımlanabilir olmaları şeklinde sıralanabilir (Botstein ve ark., 1980; Helentjaris ve ark., 1985; Williams ve ark., 1990). Moleküler markörler; rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA markörleri (RAPD), çoğaltılan parça uzunluğu polimorfizmi (AFLP), kesilen parça uzunluğu polimorfizmi (RFLP), dizisi etiketlenmiş sekanslar (STS), basit dizi tekrarları (SSR), bölünerek çoğaltılmış polimorfik dizi (CAPS), tek iplik konformasyon polimorfizmi (SSCP), ampikon uzunluk polimorfizmi (ALP), basit sekans tekrarlamaları arası polimorfizm (ISSR), ifade edilmiş dizi etiketleri (EST), tek nükleotid polimorfizmi (SNP), rastgele çoğaltılmış mikrosatellit polimorfizmi (RAMP), sekansa bağlı çoğaltılmış polimorfizm (SRAP), hedef bölge çoğaltma polimorfizmi (TRAP) gibi belirleyicilerden oluşmaktadır.

Canlı genomunda çok sıklıkla tekrarlanan DNA dizileri bulunmaktadır. Bu diziler belirli sayılarda tekrarlanmaktadır ve dizilerin genomun neresinde bulunduğu ve kaç defa tekrarlandığı türden türe değişiklik göstermektedir. Aynı tür içindeki fertler arasında da bu dizilerin bulunup bulunmamasına dayalı olarak SSR tekniği geliştirilmiştir. Tekrarlanan bölgelere özgü spesifik primerler geliştirilmekte ve bu primerler ile PCR yapılmaktadır. PCR ürünleri, elektroforesis yapıldıktan sonra ethidium bromide veya gümüş nitrat kullanılarak boyandıktan sonra polimorfizm aranmaktadır. Tekniğin, kodominant yapı göstermesi ve tekrarlanabilir olması en önemli avantajını; genom bilgisine ve dizilim analizine ihtiyaç duyulması dezavantajını oluşturmaktadır (Devran 2016, Rangwen ve ark., 1995, Ridout ve Donini, 1999).

Tahıl paslarının oluşturduğu hastalığın kontrolünde genetik dayanıklı çeşitlerin kullanılması önem taşımaktadır. Genetik dayanıklılık pas hastalıklarının oluşturduğu verim kayıplarını azaltmada en ekonomik ve tercih edilen yöntemdir (Kolmer 1996). Genetik dayanıklı olarak geliştirilen yeni çeşitler fungusit kullanımının, üretim maliyetlerinin ve çevre kirliliği riskinin azaltılmasına katkıda bulunmaktadır.

Yapılan çalışmanın amacı Trakya Bölgesi'nde Trakya Bölgesi'ne yönelik ıslah edilecek yüksek verimli ve kaliteli genotiplerin elde edilmesi çalışmasında kahverengi pasa dayanıklı yeni genotiplerin hızlı ve güvenilir şekilde seçilmesidir. Bu amaçla Saban, F85 ve Pehlivan çeşitleri ile *Lr 9*, *Lr 14*, *Lr 19*, *Lr 22*, *Lr 24* ve *Lr 34* dayanıklılık genlerini içeren hatlar arasında yapılan melez F₂ kombinasyonlarında SSR markırlar kullanılarak dayanıklı genotiplerin hızlı şekilde belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Roelfs (1988) *Lr 34'* ün *Lr 12* ve *Lr 13* ile kombinasyonlarının dünya çapında kahverengi pasa dayanıklı çeşitler sağladığını belirtmiştir.

German ve Kolmer (1992) yaptıkları çalışmada *Lr 34* geninin diğer *Lr* genleri ile bitkilerde kombine edildiğinde kahverengi pasa dayanıklılığın sağladığını belirtmişlerdir.

Arslan ve ark. (2002) Bursa ili ekolojik koşullarında 2000-2001 yetiştirme sezonunda Buğday Kahverengi Pası (*Puccinia recondita* Roberge ex Desmaz. f.sp. *tritici*)'na karşı 10 ekmeklik buğdayın (3 çeşit ve 7 hat) reaksiyonlarını ve verim kayıplarını belirlemek amacıyla yürüttükleri çalışmada Kahverengi Pas'a karşı Marmara-86 çeşidinin orta derecede duyarlı (MS), diğer 9 çeşit ve hattın duyarlı (S) olduğu saptamışlardır. Regresyon analizleri sonucunda hastalık şiddetinin her %1'lik artışında ortalama kayıpların tane veriminde 4.07 kg/da (% 0.17), 1000 tane ağırlığında ise 0.13 g (% 0.12) olduğu belirlemişlerdir. Hastalık şiddetine bağlı olarak ortalama kayıplar tane veriminde 53.1 kg/da (% 9.4), 1000 tane ağırlığında ise 4.3 g (% 9.3) olarak bulmuşlardır.

Herdem (2002) kahverengi pasın buğday, arpa, triticale ve bunlara akraba birçok cinsi hastalandırabildiğini, hastalığın serin iklim tahıllarının yetiştirildiği her yerde görülebildiğini ve hastalık etmeninin epidemi yaptığı bölgelerde yerleşerek, uzun yıllar potansiyel tehlike olarak enfeksiyon yaptığını belirtmiştir.

Singh ve ark. (2004) Asya Kıtasının batı bölgelerindeki buğday alanlarında kahverengi pas hastalığının %30 oranında zarara neden olduğunu, merkez bölgelerde özellikle hassas çeşitlerin ekili olduğu alanlarda ise bu zararın %90'lara ulaştığını tespit etmişlerdir.

Gomari ve ark. (2006) 35 *Lr* geninin dayanıklılığının etkililiğini test etmek için yaptığı çalışmada, tarla arazilerinde doğal koşullarda inokuluma maruz bırakmış *Lr 24*, *Lr 25* ve *Lr 28* ile hatların sahada yaprak pası hasarı yaşamadığını ve *Lr 9*, *Lr 18*, *Lr 35*, *Lr 36* ile *Lr 27* + *Lr 31* kombinasyonunun, % 10'dan daha az hastalık şiddeti gösterdiğini belirtmiştir.

Marsalis and Goldberg (2006) pas fungusunun kompleks bir yaşam çemberi olduğunu, pasların yaşam döngüsünü tamamlamak için iki özel konukçu bitkiye ve 5'e kadar varan farklı spor devresine ihtiyaç duyduğunu, konukçu bitkilerden birisinin ekonomik öneme sahip bitki olduğunu, diğer konukçu bitkinin ise yabancı otlar ya da doğal bitkiler olduğunu belirtmiştir.

Aykut (2007) yaptığı çalışmada markörler yardımıyla seleksiyonda kullanabilmek için, kahverengi pas dayanıklılık geni *Lr 13*'e ait moleküler markörleri geliştirmeyi amaçlamıştır ve elde edilen sonuçlardan 6 adet AFLP primer kombinasyonu (E34, M70, E45 M67, E43 M75, E49 M67, E47 M64 ve E57 M69) ile mikrosatelit primeri Wms 630'un sadece 12 No'lu hatta spesifik bantlar verdiğini gözlemiş ve bu primerlerin incelenen materyalde *Lr 13* genine aday markörler verebileceğini belirlemiştir. Ayrıca ekmeklik buğdayda AFLP ve SSR tekniklerinin kahverengi pas dayanıklılık genlerini araştırmada yararlı olduğunu saptamıştır.

Akın ve ark. (2008) 94 buğday genotipi ile 39 kahverengi pas ayırıcı hattında tarla tepkileri, yavaş paslanma düzeyleri ve ayırıcı hatlardaki olası dayanıklılık genlerini araştırmışlardır ve araştırma sonucunda *Lr 13*, *Lr 14a*, *Lr 14b*, *Lr 11*, *Lr 30* ve *Lr 32* dışındaki genlerde dayanıklılığının sürdüğü ve 16, 19, 49, 53, 74, 56, 61, 68, 46, 71, 5, 47 ve 48 numaralı genotipler dışındakilerin yavaş paslandıklarını açıklamışlardır.

Vanzetti ve ark. (2011) ekmeklik buğdayda 14 *Lr* geninde yaptıkları çalışmada *Lr 16* içeren gen kombinasyonların ya da tek gen *Lr 47*, *Lr 19*, *Lr 1* dayanıklılık genleri içeren genotiplerin hastalık patojenlerinin çoğuna dayanıklılık gösterdiğini, buna karşın *Lr1*, *Lr3a*, *Lr 3a + Lr 24*, *Lr 10*, *Lr 3a + Lr 10*, *Lr 3a + Lr 10 + Lr 24* içeren genotiplerin ise yüksek dayanıklılık gösterdiğini ayrıca geç dönem dayanıklılığı için *Lr34*, *Lr 35* ve *Lr 37* içeren lokal germplazmaların özel primerler kullanarak değerlendirmişler ve kahverengi pasa karşı *Lr 34* ve *Lr 46'* nın yüksek dayanıklılık gösterdiğini *Lr 16*, *Lr 47*, *Lr 19*, *Lr 41*, *Lr 21*, *Lr 25* ve *Lr 29'* un ise yüksek düzeyde fide dayanıklılığı gösterdiğini belirtmişlerdir.

Ashwini Charpe ve ark. (2012) Hindistan'da yaptıkları bir çalışmada kahverengi pasa dayanıklılıkta yüksek etkinliğe sahip olan üç geni (*Lr 9*, *Lr 24* ve *Lr 28*) geriye melezleme ile HD2329 ekmeklik buğday çeşidine aktarmışlardır. Yaptıkları çalışmada bu üç genin fide dönemi ve geç dönemde kahverengi pas hastalığına dayanıklılıkta önemli genler olduğunu belirlemişlerdir.

Abdelbacki ve ark. (2013) ekmeklik buğday çeşitlerinde kahverengi pasa karşı dayanıklılığı ve en çok yayılan ırkı tanımlamak için yaptıkları çalışmada, on (10) ekmeklik buğday çeşitinde en sık görülen genin *Lr 35* (% 70) olduğunu ve bunu *Lr22* (% 60), *Lr 7* (% 40), *Lr 34* (% 30), *Lr 19* (% 30), *Lr 18* (% 10), *Lr 36* (% 10) ve *Lr 46'* nın (% 10) izlediğini belirtmişlerdir.

Ay (2013) 126 ekmeklik buğday çeşidinde iki yılda sarı, kahverengi ve kara pas hastalıklarının sadece tabii ortamda bulunan pas ırklarının ekmeklik buğdayda yaptığı epidemiler göz önüne alınarak değerlendirmeler yapmıştır. 49 ekmeklik buğday çeşidinin sarı pasa dayanıklı, 6 ekmeklik buğday çeşidinin sarı pasa orta dayanıklı olduğunu, 2 ekmeklik buğday çeşidinin sarı pasa orta hassas olduğunu, 12 ekmeklik buğday çeşidinin kahverengi pasa dayanıklı, 4 ekmeklik buğday çeşidinin kahverengi pasa orta dayanıklı, 4 ekmeklik buğday çeşidinin kahverengi pasa orta hassas ve 3 ekmeklik buğday çeşidinin ise kahverengi pasa hassas olduğunu, 21 ekmelik buğday çeşidinin kara pasa dayanıklı, 10 ekmeklik buğday çeşidinin orta dayanıklı olduğunu, 12 ekmeklik buğday çeşidinin orta hassas olduğunu, 9 ekmeklik buğday çeşidinin hassas olduğu tespit etmiştir.

Huseynova ve ark. (2013) 61 buğday çeşidinde kahverengi pasa dayanıklılığın *Lr 19* ile ilişkisini belirlemek amacıyla SCAR- markörler kullanmışlardır. Elde edilen sonuçlar *Lr 19* geninin 45 genotipin 7D kromozomunda bulunduğunu ve analiz edilen 61 buğday genotipinden sadece 5 tanesinde *Lr 19* geninin bulunmadığını açıklamışlardır.

Davoyan (2014) yaptıkları çalışmada Lukyanenko Enstitüsü'nde yetiştirilen buğdayda 1920 bitki ve 46 ticari çeşitte *Lr 9*, *Lr 10*, *Lr 19*, *Lr 24*, *Lr 26*, *Lr 34* ve *Lr 37* kahverengi pasa dayanıklılık genlerini moleküler markerlar ile taramışlar, analiz edilen çeşitlerin genellikle *Lr10*' un dayanıklılıkta etkisiz olduğunu, *Lr 26* ve *Lr 34* ün ve bunların kombinasyonlarının zayıf etkili olduğunu kahverengi pasa dayanıklılıkta yüksek etkili olan *Lr 9* ve *Lr 24* genlerinin tespit edilmediğini belirtmişler, bazı varyetelerde kahverengi pasa dayanıklılıkta etkili olan genlerin *Lr 19* ve *Lr 37* olduğunu belirlemişlerdir.

Demir ve arkadaşları (2014), Sakarya koşullarında kahverengi pasın ekmeklik buğdayda %65– 100 hastalık şiddetinde %7,5–56,4 arasında değişen oranlarda verim kaybı meydana getirdiğini bildirmişlerdir.

Gorash ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) ve *Aegilops cylindrica* Host, *Aegilops tauschii* Coss., *Triticum dicoccoides* Koern. ve sentetik tür *Triticum erebuni* Gandil. arasında yapılan melezlemeler ile kahverengi pasa dayanıklı ekmeklik buğday hatları geliştirmişler, ıslah edilen ekmeklik buğday hatlarında inekulasyon yaparak buğday bitkilerinin fide aşamasında kahverengi pasa dayanıklılıklarını incelemişlerdir. *Lr 21*, *Lr 22a*, *Lr 24*, *Lr 32*, *Lr 34*, *Lr 39*, *Lr 42*, *Lr 53* ve *TIAL.1RS* dayanıklılık genlerini STS ve SSR markörleri kullanılarak bir moleküler analiz ile

tanımlamışlardır. Fitapatolojik değerlendirme ve moleküler genetik analiz verilerinin karşılaştırılması sonucu ıslah hatlarında kahverengi pas dayanıklılığının birkaç gen kombinasyonu ile sağlandığını belirtmişlerdir. *Lr 24 + Lr 34+TIAL.IRS* kombinasyonunun kahverengi pasa dayanıklı, *Lr 24 + Lr34 + Lr 21, TIAL.IRS + Lr24 ve Lr 21 + TIAL.IRS + Lr 24* gen kombinasyonlarının ise dayanıklı ve orta dayanıklı olduklarını tanımlamışlardır.

Haque ve ark. (2014) yaptıkları çalışma sonunda elde ettikleri kahverengi pas hastalığına dayanıklı germplazmların kahverengi pas hastalığından kaynaklanan ekonomik zararı önlediğini belirtmişlerdir.

Aybeke (2015) yaptığı çalışmada kahverengi pas hastalığının buğdayda önemli bir fungal hastalık olduğunu bütün dünyada önemli verim kayıplarına neden olduğunu vurgulamış; *Lr 9, Lr 19, Lr 24 ve Lr 28* gibi çeşitli *Lr* genlerinin çeşitlerde ve örneklerde ıslah süresince başarılı bir şekilde taranmasının öneminden bahsetmiştir. Yapılan çalışmada bu 4 geni içine alacak şekilde Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun (PZR) tek seferde uygulanabileceği bir yöntemin oluşturulmasından bahsetmiştir.

Cristina ve arkadaşları (2015) yaptıkları çalışmada ıslah edilmiş 50 ekmeklik buğday hattında *Lr 34 ve Lr 37* kahverengi pasa dayanıklılık genleri moleküler markırlar kullanılarak taramış, moleküler analizler sonucu *Lr 34* dayanıklılık geni analiz edilen toplam genotiplerin (homozigot genotipler) % 62'sinde, *Lr 37* dayanıklılık genini ise % 40'ında tespit etmişlerdir. Ayrıca, her iki dayanıklılık genini taşıyan bir hat bulduklarını belirtmişlerdir.

Draz ve ark. (2015) Mısır' da *Puccinia triticina* Eriks.'in ekmeklik buğdaylarda kahverengi pas hastalığına neden olduğunu ve ürünlerde %50 verim kayıpları meydana getirdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca genetik dayanıklılığın hastalığın neden olduğu verim kayıplarını azaltmanın en ekonomik ve etkili yolu olduğu öneminden bahsetmişlerdir. Yaptıkları çalışmada 42 Mısır buğday çeşidini kahverengi pas için taramışlar ve sadece 9 çeşidin fide ve yetişkin dönemlerde direnç gösterdiklerini belirtmişlerdir.

Sohail ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada buğday çeşit ve *hatlarının Lr 9, Lr 13, Lr 19, Lr 20, Lr 24, Lr 26, Lr 28, Lr 34, Lr 37 ve Lr 47* genlerine dayanıklılık yönünden test etmişlerdir. Tarla koşullarında elde edilen veriler sonucunda *As-02 (Lr 10 + 26 + 34), Bhakar-02 (Lr 13) ve Shafaq-06 (Lr 10 + 13 + 27)* kahverengi pasa dayanıklı, *Pasban-90 (Lr10 + 13 + 26 + 27), Chenab-2000 (Lr 10 + 13 + 26 + 27 + 31 + 34), Fbd-08 (Lr 10),*

Millat-11 ve *Punjab-11* orta dayanıklı, *Blue silver* (*Lr 13 + 14a*), *Pak-81* (*Lr 10 + 23 + 26 + 31*), *Bahawalpur-97* (*Lr 13 + 26*), *Lasani-08* (*Lr 13 + 27 + 31*) *Sh-88*, *Auqab-2000* (*Lr 10 + 23 + 26 + 27 + 31*), *Iqbal-2000* (*Lr 3 + 10 + 13 + 26 + 27 + 31*), *Bahawalpur-2000* (*Lr 34*) ve *Seher-06* (*Lr 10 + 27 + 31*) yüksek duyarlı olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışma Pakistan çeşitlerinin *Lr 3*, *Lr 10*, *Lr 13*, *Lr 14a*, *Lr 23*, *Lr 26*, *Lr 27*, *Lr 31* ve *Lr34* genlerini taşıdığını ve *Lr 9*, *Lr 19*, *Lr 24* ve *Lr28* genlerini taşımadığı belirtmiştir.

Sharif ve ark. (2016) buğday çeşitlerinde, 4 lokasyonda, SSR Primerleri kullanarak *P.triticina* f. sp. *tritici*' ye karşı olan dirençlerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada *Lr 9*' un iki çeşitte, *Lr 25*' in dokuz çeşitte ve *Lr28*' in beş çeşitte bulunarak kahverengi pasa karşı dayanıklılık gösterdiklerini belirtmişlerdir.

Demir ve ark.(2017) Sakarya koşullarında yaptıkları çalışmada 136 tescilli ekmeklik buğday çeşidinde doğal epidemi koşullarında sarı ve kahverengi pasa karşı dayanıklılığını belirlemişlerdir. 2014-2015 ürün yılında sarı pasa 91 çeşit dayanıklı, 25 çeşit hassas ve kahverengi pasın gelişmediğinin belirlemişler ve 2015-2016 ürün yılında ise sarı pasa 93, kahverengi pasa ise 18 çeşidi dayanıklı ve orta dayanıklı olarak tespit etmişlerdir. Sarı ve kahverengi pasa karşı dayanıklı ve orta dayanıklı bulunan çeşitlerin ıslah projesi kapsamında dayanıklı çeşit geliştirme çalışmalarında ebeveyn olarak kullanılacağını belirtmişlerdir.

Kılıç (2017) yaptığı çalışmada Trakya Bölgesi'nde *Lr 9*, *Lr 19* ve *Lr 24* kahverengi pas dayanıklılık genlerinin bölgedeki tüm pas ırklarına karşı dayanıklılık sağlamadığını belirtmiştir. Yaptığı çalışmada bu genlerle bağlantılı olduğu rapor edilen aday moleküler markırlar test etmiştir. Çalışma sonucunda *Lr 9* geni için SCS5, *Lr 19* geni için S253, S265, GbF/GbR ve Xwmc221, *Lr 24* geni için J09-1/J09-2 ve H51/H52 markırları selektif bulmuş ve yapılacak ıslah çalışmalarında markır destekli seleksiyon (MAS)'da başarıyla kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

Gülfidan (2018) NKÜ Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'ne ait 20 ekmeklik buğday F₂ hatlarında *Lr 9*, *Lr 14*, *Lr 19*, *Lr 24*, *Lr 4* ve *Lr 35* genlerini taşıyıp taşımadıklarını belirlemek amacıyla Basit Dizi Tekrarları (SSR) analizleri ile 6 SSR markır kullanarak kahverengi pasa dayanıklılığın moleküler karakterizasyonunu belirlemiştir. Yapılan çalışma sonucunda F₂ hatlarının tümünde *Lr 9* ve *Lr 24* genlerinin taşıdığı, *Lr 14* geninin 16 F₂ hattında, *Lr 35* geninin 14 tane F₂ hattında, *Lr 19* geninin 3 F₂ hattında, *Lr 34* geninin 5 F₂

hattında bulunduğu belirlemiş olup kahverengi pas çalışmalarında *Lr 9* ve *Lr 24* genine dayanıklılığın öncelikli olarak dikkate alınması gerektiğini belirtmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Araştırma, 2016-2017 yetiştirme döneminde Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Deneme Alanı'nda tesadüf blokları deneme desenine göre yürütülmüştür. 2016 yılında ekimi yapılan Pehlivan, Sana, Tina, Tekirdağ, Gelibolu, Nina, F-85, Saban, Kate A-1 buğday genotiplerine *Lr 9*, *Lr 14*, *Lr 19*, *Lr 22*, *Lr 24*, *Lr 34* kahverengi pas dayanıklılık genlerini içeren izogenik hatlardan melezleme yapılmıştır. Yapılan melezleme sonucunda elde edilen F₂ generasyonlarının her kombinasyonundan 10 ayrı bitki seçilerek kullanılmıştır. Materyal olarak kullanılan melez kombinasyonları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan melezler

Melez Kombinasyonları	Melez Kombinasyonları	Melez Kombinasyonları
Pehlivan / <i>Lr 9</i>	Sana / <i>Lr 9</i>	Kate A- 1 / <i>Lr 9</i>
Pehlivan / <i>Lr 14</i>	Sana / <i>Lr 14</i>	Kate A- 1 / <i>Lr 14</i>
Pehlivan / <i>Lr 19</i>	Sana / <i>Lr 19</i>	Kate A- 1 / <i>Lr 19</i>
Pehlivan / <i>Lr 22</i>	Sana / <i>Lr 22</i>	Kate A- 1 / <i>Lr 22</i>
Pehlivan / <i>Lr 24</i>	Sana / <i>Lr 24</i>	Kate A- 1 / <i>Lr 24</i>
Pehlivan / <i>Lr 34</i>	Sana / <i>Lr 34</i>	Kate A- 1 / <i>Lr 34</i>
Saban / <i>Lr 9</i>	Tina / <i>Lr 9</i>	Nina / <i>Lr 9</i>
Saban / <i>Lr 14</i>	Tina / <i>Lr 14</i>	Nina / <i>Lr 14</i>
Saban / <i>Lr 19</i>	Tina / <i>Lr 19</i>	Nina / <i>Lr 19</i>
Saban / <i>Lr 22</i>	Tina / <i>Lr 22</i>	Nina / <i>Lr 22</i>
Saban / <i>Lr 24</i>	Tina / <i>Lr 24</i>	Nina / <i>Lr 24</i>
Saban / <i>Lr 34</i>	Tina / <i>Lr 34</i>	Nina / <i>Lr 34</i>
F85 / <i>Lr 9</i>	Tekirdağ / <i>Lr 9</i>	Gelibolu / <i>Lr 9</i>
F85 / <i>Lr 14</i>	Tekirdağ / <i>Lr 14</i>	Gelibolu / <i>Lr 14</i>
F85 / <i>Lr 19</i>	Tekirdağ / <i>Lr 19</i>	Gelibolu / <i>Lr 19</i>

F85 / Lr 22	Tekirdağ / Lr 22	Gelibolu / Lr 22
F85 / Lr 24	Tekirdağ / Lr 24	Gelibolu / Lr 24
F85 / Lr 34	Tekirdağ / Lr 34	Gelibolu / Lr 34

3.2. Araştırma Yerinin Özellikleri

Yapılan bu çalışmada çeşitlerin ve dayanıklı genlerin yetiştirilmesi, melezleme çalışmaları 2016-2017 yıllarında Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme tarlasında gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Toprak Özellikleri

Araştırmanın yürütüldüğü deneme alanına ait toprağın fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Deneme alanına ait toprak analiz sonuçları

Toprak Özellikleri	Tekirdağ	
	0-20 cm	20-40 cm
Su ile doymuşluk (%)	40	41
pH	6.25	6.52
Kireç (%)	0.01	0.01
Bitkilere yararışlı fosfor (1.39-3.26) (ppm)	16	15
Bitkilere yararışlı kalsiyum (1150-3500)(ppm)	2807	2406
Bitkilere yararışlı magnezyum (160-480) (ppm)	429	386
Bitkilere yararışlı potasyum (140-370) (ppm)	169	164
Bitkilere yararışlı demir (2-4.5)(ppm)	27	25
Bitkilere yararışlı mangan (14-50)(ppm)	25	20
Bitkilere yararışlı çinko(0.7-2.4) (ppm)	0.32	0.41
Organik madde (%)	1.08	1.11

Kaynak : Toprak analizi Tekirdağ Ticaret Borsasında yaptırılmıştır.

3.2.2. İklim Özellikleri

Araştırmanın yürütüldüğü 2016-2017 buğday yetiştirme dönemine ait ortalama sıcaklık, toplam yağış ve oransal nem değerleri ile uzun yıllar ortalamaları Çizelge 3.3' de verilmiştir.

Çizelge 3.3. 2017/2018 döneminde deneme yerine ait iklim değerleri

Aylar	2017/2018				Uzun Yıllar				
	Aylık Top Yağış (mm)	Sıcaklık °C			Aylık toplam Nisbi %	Aylık Top Yağış (mm)	Sıcaklık °C		
		En düşük	En yüksek	Ortala ma			En düşük	En yüksek	Ortala ma
EKİM	111.2	4.1	24.2	14.9	77.0	55.2	-0.2	32.0	15.2
KASIM	85.2	3.4	20.9	11.7	83.3	81.3	-6.9	27.9	11.4
ARALIK	94.8	-0.3	19.3	9.5	80.9	86.2	-10.9	21.6	7.2
OCAK	76.5	-0.6	13.9	6.6	85.4	69.9	-13.5	21.5	4.4
ŞUBAT	95.3	-1.8	19.7	7.2	86.0	54.7	-13.5	22.2	5.3
MART	63.7	3.5	23.2	10.2	86.5	55.6	-9.0	28.1	6.8
NİSAN	10.6	6.3	25.3	14.0	76.3	42.9	-1.0	34.3	11.5
MAYIS						37.6	2.7	33.8	16.6
HAZİRAN	75.4	14.0	30.4	22.4	73.8	37.8	9.2	34.0	28.9
	612.7								

Kaynak : Tekirdağ Meteoroloji Müdürlüğü

3.3. Yöntem

Yapılan çalışmada kullanılan materyali, CIMMYT (International Maize and Wheat Improvement Center)'den temin edilmiş kahverengi pasa dayanıklı genleri içeren izogenik hatlar (*Lr 9, Lr 14, Lr 19, Lr 22, Lr 24, Lr 34*) ve Pehlivan, Sana, Tina, Tekirdağ, Gelibolu, Nina, F-85, Saban, Kate A-1 ekmeklik buğday çeşitleri arasında yapılan melezlerin erken generasyonları oluşturmaktadır.

Belirtilen *Lr* dayanıklılık genleri içeren izogenik hatlar ve ekmeklik buğday çeşitleri 2016 yılı Kasım ayında 6 m uzunluğundaki sıralara farklı parsellerde olacak şekilde

ekilmiştir. Parsellere ekim sırasında dekara 6 kg/da azot ve 6 kg/da fosfor, sapa kalkma başlangıcında dekara 7 kg/da azot ve başaklanmadan önce 5 kg/da azot uygulanarak gübreleme yapılmıştır. 2017 yılı Mayıs ayında gerçekleştirilen melezleme işleminde ana olarak ekmeklik buğday çeşitleri ve baba olarak ise *Lr* dayanıklılık genleri kullanılmıştır. Ana olarak seçilen başaklardan anterler uzaklaştırılmıştır (emaskülasyon). Emaskülasyon işlemini takiben 1-2 gün içinde tozlayıcı olarak belirlenen bitkilerden alınan başaklar ile tozlama yapılmıştır. Hasat işlemi Haziran ayında melezlerde tek başaklar halinde, dayanıklı gen ve çeşitlerde ise sıralar halinde yapılmıştır.



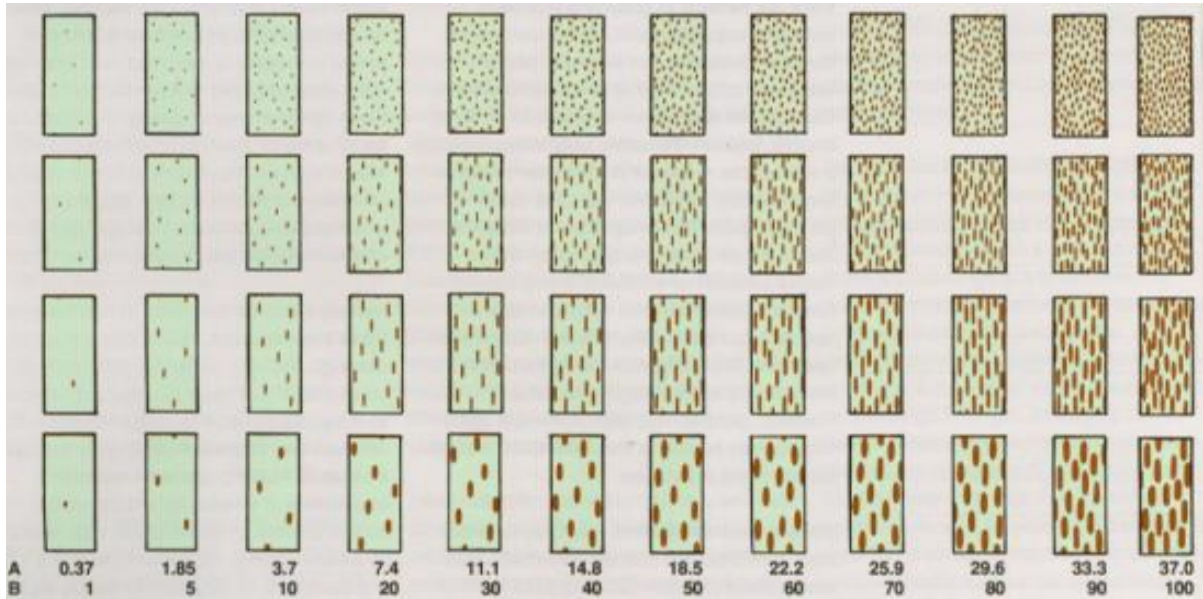
Şekil 3.1. Melezleme işlemi uygulanan başak

Hasat yapılan melez başaklar elde ayıklanarak tohumları elde edilmiştir. Elde edilen melezlerin 2017 Kasım ayında 5 m uzunluğundaki sıralara ekimi yapılmıştır. Her 10 sıradan sonra kahverengi pasa hassas olan Morocco çeşidi kontrol (yayıcı) çeşit olarak 2 sıra olacak şekilde ekim yapılmıştır. Ayrıca, hastalık etmeninin homojen yayılması için deneme alanının çevresine hassas çeşitler ekilmiştir. Ekim sonrası çıkış gösteren bitkilerin 7 günlük fidelerinden DNA izolasyonu için yaprak örnekleri alınmıştır. Her genotipten ayrı olarak steril bisturi yardımıyla sağlıklı ve genç bitki yapraklarından örnek alınmıştır. Araştırmanın ilerleyen aşamalarında herhangi bir nedenden dolayı örnek kaybını engellemek amacıyla örnek alınan bitkilerden yedek olarak yaprak örneği alınmıştır. Alınan yaprak örnekleri sıvı azotta dondurularak -80 °C dondurucuda DNA izolasyonu yapılincaya kadar muhafaza

edilmiştir. Her bir melez kombinasyonu için 10 ayrı bitkiden örnek alınmıştır. Çalışmada moleküler araştırmalar için 187 bitki kullanılmıştır.

3.3.1. Morfolojik Tanımlama

Araştırmada ekmeklik buğday genotipleri, *Lr* genleri içeren izogenik hatlar ve bunların melezlenmesi sonucu elde edilen F₂ populasyonları deneme alanına her genotip için 2 sıra olmak üzere 5 metrelik sıralara 3 tekrarlamalı olarak ekilmiştir. Ekim sırasında denemenin başına, sonuna ve her 10 sırada bir olmak üzere kahverengi pasa hassas olan Morocco genotipi ekilmiştir. Deneme alanındaki bitkilerde hastalık değerlendirmeleri 2 dönemde (erken- geç) Modifiye edilmiş Cobb skalası (Peterson et al. 1948) baz alınarak yapılmıştır. Modifiye edilmiş Cobb skalası kullanılarak yapılan hastalık okumalarında hastalık (pas) şiddeti ve enfeksiyon tipi belirlenmiştir. Hastalık şiddeti belirlenirken bayrak yapagında bulunan pas püstülleriyle kaplı olan alanın yaprak alanına olan oranı (%) hesaplanmıştır. Pas şiddeti değerlendirmeleri gözleme dayanmaktadır ve 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 kademeleri kullanılarak hastalık değerlendirmeler yapılmaktadır. Modifiye edilmiş Cobb skalasına göre yapılan hastalık değerlendirmelerinde pas püstülleri yaprak alanının %37'sini kapladığında enfeksiyon şiddeti %100 olarak kabul edilmektedir.

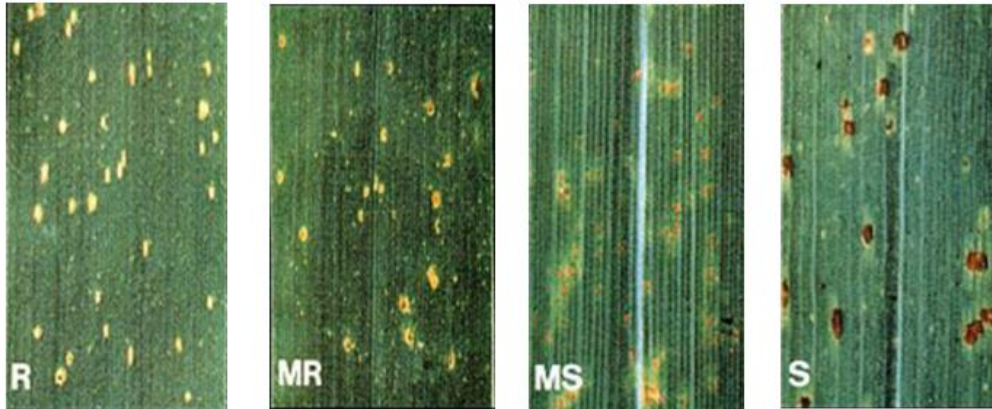


Şekil 3.2. Pas şiddetinin belirlenmesinde kullanılan Modifiye edilmiş Cobb skalasının (Peterson et al. 1948) şematik gösterimi (A: Pas püstüllerinin yaprak üzerinde kapladığı gerçek alan B: Modifiye edilmiş Cobb skalasına göre belirlenen % pas şiddeti)

Hastalık değerlendirmeleri sırasında bitkilerde gözlenen kahverengi pas enfeksiyon tipinin belirlenmesi Çizelge 3.' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Pas hastalık şiddeti ve enfeksiyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Modifiye edilmiş Cobb skalası (Peterson et al. 1948)

Enfeksiyon Tipi	Konukçu Tepkisi	Hastalık Belirtisi
R	Dayanıklı	Nekrotik ve klorotik alanlar görülmekte, püstüller yok
MR	Orta Dayanıklı	Nekrotik ve klorotik alanlar görülmekte, püstüller çok küçük
MS	Orta Duyarlı	Küçükten orta büyüklüğe kadar püstüller görülmekte, nekrotik alan yok fakat belirgin klorotik alanlar bulunabilir.
S	Duyarlı	Orta büyüklükte püstüller görülmekte, nekrotik alan yok, küçük klorotik alanlar görülebilir.



Şekil 3.3. Buğdayda kahverengi pas hastalığının değerlendirilmesi (Roelfs ve ark 1992)

3.3.2. Moleküler Karakterizasyon

Yapılan çalışmada kahverengi pasa dayanıklılığın moleküler karakterizasyonunu belirlemek amacıyla Basit Dizi Tekrarları (SSR) analizleri kullanılarak Pehlivan, Saban, Flamura-85 ekmeklik buğday genotipleri ve *Lr 9*, *Lr 14*, *Lr 19*, *Lr 22*, *Lr 24* ve *Lr 34*

dayanıklılık genleri içeren izogenik hatlar ile melezlenmesi sonucu elde edilen F₂ popülasyonlarının moleküler tanımlamaları yapılmış ve genotipik farklılıkları belirlenmiştir. Yapılan çalışmada moleküler genetik çalışmalar Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Bitki Islahı ve Genetik Laboratuvarı' nda gerçekleştirilmiştir.

3.3.2.1. Sterilizasyon

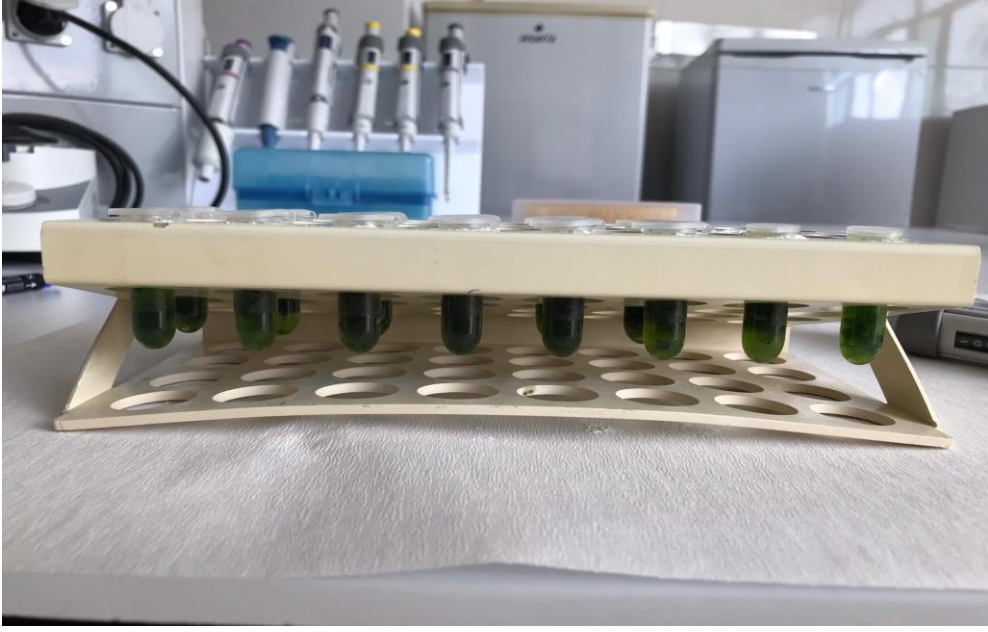
DNA izolasyonu sırasında kullanılan santrifuj, hassas terazi, pipetler, pipet uçları gibi kullanılan malzemeler oluşabilecek kontaminasyonu engellemek amacıyla usulüne uygun olarak sterilize edilmiştir.

3.3.2.2. DNA İzolasyonu

1. Bu çalışmada DNA İzolasyonu modifiye edilmiş cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) yöntemine göre tarla koşullarında yetiştirilen bitki materyallerine ait 7 günlük fidelerden alınan yaprak örnekleri ile yapılmıştır.
2. Tarladan alınan yaprak dokuları 2 ml ependorf tüp içine alınarak -20 °C' de bekletildikten sonra iyice toz haline gelene kadar parçalanır.
3. Parçalanmış yaprak dokusu üzerine 600 µl DNA ekstraksiyon solüsyonu ve PVP eklenir vorteks yapılarak tamamen karışması sağlanır.

Çizelge 3.5. DNA ekstraksiyon solüsyonu bileşenleri

Ekstraksiyon solüsyonu	15x	Konsantrasyon
TRİS- HCl (1M)	1.5 ml	100mM
EDTA (0.5M)	0.75 ml	25mM
NaCl (5M)	4.5 ml	1.5M
% 10 CTAB	4.5 ml	%3 (w/v)
B-mercaptoethanol (14,3 M)	0,045ml	%3 (v/v)
Distile su	3.705 ml	
Son Konsantrasyon	15ml	



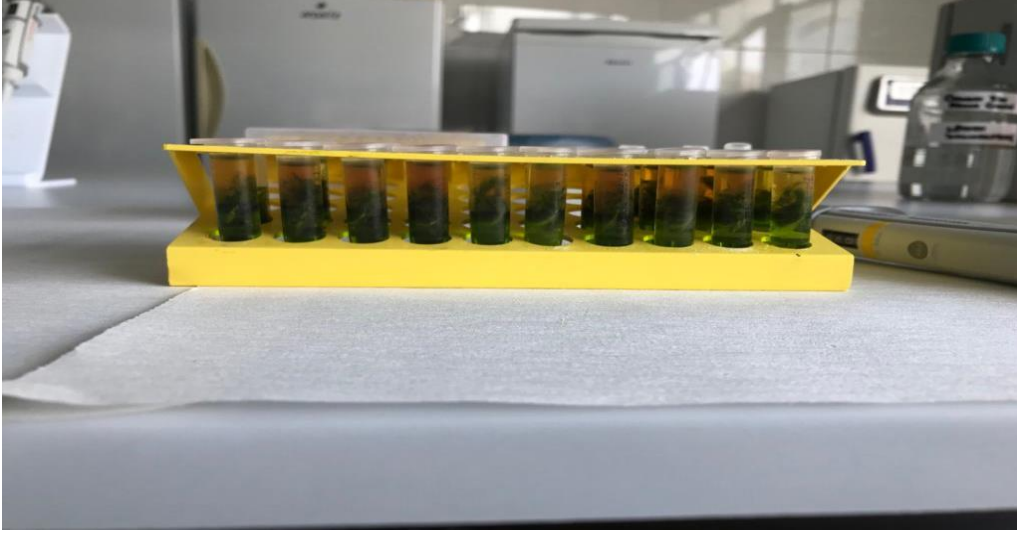
Şekil 3.4. Özütlemeye tamponu eklenerek parçalanmış yaprak örnekleri

4. Örnekler 65 °C’ de 15 dakikada bir vorteks yapılarak 1 saat inkübasyon yapılır ve inkübasyon yapılan örnekler 5 dakika oda sıcaklığında bekletilir.



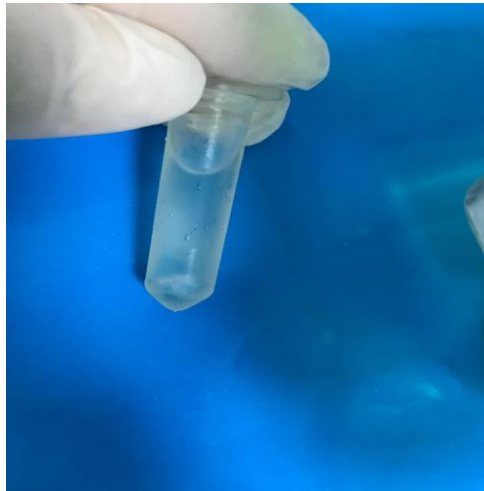
Şekil 3.5. Örneklerin 65 °C’ de inkübasyon yapılması

5. Her örneğe 600 µl soğuk kloroform:isoamilalchol eklenerek vorteks yapılır.
6. Örnekler 13000 rpm'de 10 dakika santrifuj yapılarak DNA'nın çözüldüğü sıvı fazın ayrılması sağlanır. DNA'nın bulunduğu üst sıvı faz (süpernatant) yeni 2 ml ependorf tüplere aktarılır (750µl).



Şekil 3.6. Santrifuj yapılan örneklerde üst fazın ayrımı

7. Örneklerin üzerine 50 µl 3M sodyum asetat eklenerek 2-3 kez ters yüz edilerek karıştırılır ve örneklerin üzerine 1000 µl soğuk etanol eklenerek tekrar karıştırılır.
8. Örnekler -20 °C' de gece boyu bekletilerek DNA'ların yoğunlaşması sağlanır.



Şekil 3.7. Soğuk etanol içerisinde yoğunlaşan DNA molekülleri

9. 13000 rpm’de 20 dakika santrifuj yapılır.
10. Bu aşamada DNA’lar ependorf tüplerin dip kısmında çökelerek pellet halini aldığı için üst sıvı dökülüp 1ml %96 etanol eklenerek 13000 rpm’de santrifuj yapılır.
11. Üst sıvı faz tekrar dökülerek 1 ml %70 alkol eklenir 13000 rpm’de santrifuj yapılır üst sıvı faz tekrar dökülerek pelletler yıkanır.
12. Yıkanan pelletler tüplerin içindeki tüm alkol uçana kadar kurutulur.
13. Tüplerin üzerine 100 µl Tris/Edta tamponu eklenerek DNA’ların çözünmeleri sağlanır.
14. 5 µl RNazA enzimi eklenerek 37°C’ de 20 dakika inkübasyon yapılır.
15. Örnekler 65 °C’ de 10 dakika inkübasyon yapılarak RNaz A enziminin inaktivasyonu sağlanır.
16. DNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20 °C’ de saklanır.

3.3.2.3. DNA Konsantrasyonu ve Safılıklarının Belirlenmesi

DNA izolasyonu tamamlanmış olan örnekler spektrofotometre (Nanodrop1000) cihazı kullanılarak DNA konsantrasyonları belirlenmiştir. Her tüpten 1µl örnek alınarak cihazın okuma bölgesine yerleştirilmiş ve her örneğin µl’inde bulunan ng cinsinden DNA miktarı belirlenmiştir.



Şekil 3.8. DNA miktarının belirlenmesinde kullanılan spektrofotometre cihazı

3.3.2.4. PCR Uygulaması

Yapılan çalışmada belirlenen *Lr* dayanıklılık genleri için 6 SSR markır kullanılmıştır. Kullanılan markırlar literatürde bulunan çalışmalar incelenerek belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan markırlar ile ilgili bilgiler Çizelge 3.6' da verilmiştir.

Çizelge 3.6. Çalışmada kullanılan *Lr* genleri, SSR primerleri ve baz dizilimleri

Gen	Genomik Lokasyon	Markır	Forward Primer Dizisi (5'-3')	Reverse Primer Dizisi (5'-3')
<i>Lr 9</i>	6BL	J13	TCCTTTTATTCCGCAC GCCGG	CCACATACCCCAAAGA GACG
<i>Lr 14</i>	7BL	Xgwm146	TCTTCATGCCCGGTTCG GGT	GGGCAGGCGTTTATTCC AG
<i>Lr 19</i>	7DL	Gb	CATCCTTGGGGACCTC	CCAGCTCGCATAATCC A
<i>Lr 22a</i>	2DS	Xgwm296	AATTCAACCTACCAAT CTCTG	GCCTAATAAACTGAAA ACCAG
<i>Lr 24</i>	3DL	J09	TCTAGTCTGTACATGG GGGC	TGGCATGAACTCCATAC G
<i>Lr 34</i>	7DS	csLV34	GTTGGTTAAGACTGGy GATGC	TGCTTGCTATTGCTGAA TAGT

1. Spektrofotometre cihazı ile DNA miktarları ölçülen örnekler 2-3 saniye 500-1000 rpm'de santrifuj edildi.
2. DNA miktar ölçümü yapılan örneklerin DNA miktarlarına göre DNA yoğunlukları eşitlendi.
3. Örneklerin PCR yükleme tampon çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan PCR yükleme tampon çözeltisi bileşeni Çizelge 3.7' de verilmiştir.

Çizelge 3.7. PCR yükleme tampon çözeltisi bileşenleri

	1x	15x
(10x) Buffer	1 µl	15 µl
MgCl ₂ (2.5mM)	0.3 µl	4.5 µl
dNTPs (5mM)	0.3 µl	4.5 µl
Primer-Forward (5mM)	1 µl	15 µl
Primer-Reverse (5mM)	1 µl	15 µl
Taq Polimeraz (5u/µl)	0.4 µl	6 µl

DNA (50ng)	2 µl	-
Distile su	4 µl	60 µl
Total	10 µl	-

4. Hazırlanan kalıp DNA örnekleri PCR tüplerine dağıtılarak üzerine hazırlanan PCR yükleme tampon çözeltisi eklendi.
5. Toplam 10 µl reaksiyon hacminde oluşturulan örneklerin PCR amplifikasyonu thermal cycler cihazında gerçekleştirildi.
6. PCR işlemi kullanılan her *Lr* dayanıklılık geni için kullanılan markıra bağlı olarak 150-210 dk arasında gerçekleşmiştir.



Şekil 3.9. Hazırlanan DNA örneklerinin PCR uygulaması

3.3.2.5. Elektroforesis

PCR ile çoğaltılan DNA fragmentleri elektroforez (Cleaver 300V) cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. Elektroforez ile DNA bant görüntülerinin elde edilmesi aşamasında tampon çözelti olarak Tris-Borik Asit- EDTA (TBE) kullanılmıştır.

3.3.2.5.1. Tris-Borik Asit- EDTA (TBE) Çözeltisinin Hazırlanması

Tris-Borik Asit- EDTA (TBE) 10X yoğunlukta hazırlanmıştır. Borik asit saf su ile çözdürülerek Tris ve ardından EDTA eklenmiştir. Oluşturulan çözeltideki kimyasalların tamamı çözüldükten sonra çözeltinin son hacmi 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Oluşturulan çözeltiden 100 ml alınarak saf su ile 1000 ml'ye tamamlanarak 1X yoğunlukta TBE elde edilmiştir. Elektroforez tankı ve agaroz jel hazırlığı için 1X yoğunluktaki TBE kullanılmıştır.

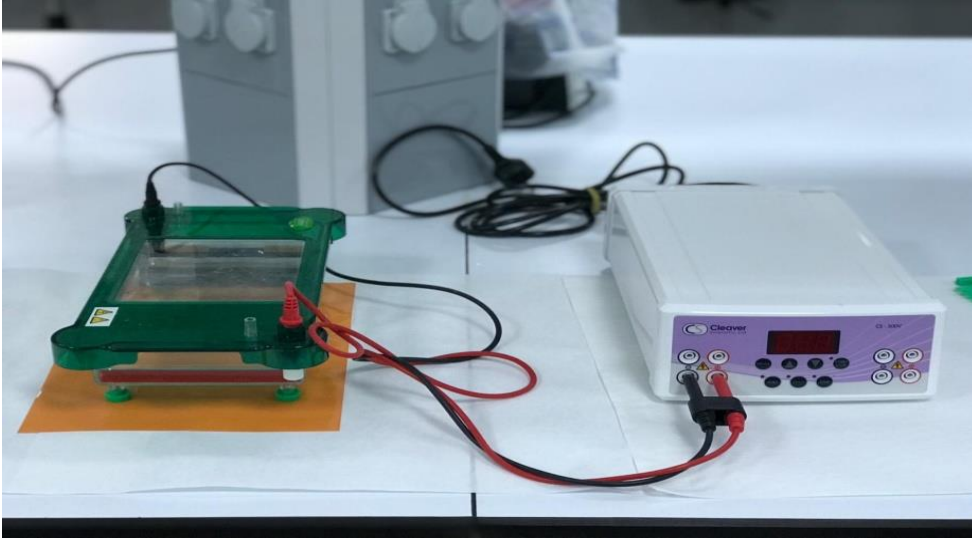
Çizelge 3.8. 10X TBE tampon çözeltisinin hazırlanması için kullanılan kimyasal maddeler ve miktarları

10X TBE Tampon Çözeltisi Kimyasalları	Kimyasal Miktarı
Borik Asit	55 g
Tris	108 g
EDTA (0.5M, pH:8)	40 ml

3.3.2.5.2. Agaroz Jelin Hazırlanması ve PCR Ürünlerinin Agaroz Jele Yüklenmesi

1. PCR'da elde edilen DNA ürünlerini elektroforezde birbirinden ayırmak için agaroz jel kullanılmıştır. 1.5 gram agaroz tartılarak erlene koyulmuş ve üzerine hazırlanan 1X yoğunluktaki TBE tampon eklenmiştir.
2. Mikrodalga fırında 3-4 dakika kaynatılarak agaroz şeffaf bir hale gelene kadar eritilmiştir ve sıcaklığı düştüğünde üzerine PCR sonucu oluşan bantların görüntüleme cihazında görüntülenebilmeleri için 3 µl redseyf boya eklenmiştir.
3. Elektroforez tankı hazırlanarak jel dökülerek taraklar yerleştirilmiş ve jelin donması beklenmiştir.
4. Jel donduğunda taraklar çıkarılarak tank içine yerleştirilmiştir.
5. Elektroforez tankı jel üstünü kapatacak şekilde TBE ile doldurulmuştur.
6. Her jel başına 2 µl leader yüklenmiştir.

7. Yüklenecek her örnek için PCR tüpleri içine 2 μ l yükleme boyası (loading dye) dağıtılmış ve 8 μ l PCR ürünü toplam 10 μ l olacak şekilde pipet yardımıyla jele yüklenmiştir.
8. Elektroforez cihazına bağlı güç kaynağı ile 70 voltta 2-3 saat arasında elektrik akımı verilmiştir.
9. Güç kaynağı kapatılarak jel UV transilluminatörde incelenmiştir.



Şekil 3.10. PCR ürünlerinin yürütüldüğü elektroforez cihazı

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Yapılan çalışmada incelenen ekmeklik buğday F₂ hatlarında kahverengi pasa dayanıklılığın hızlı ve güvenilir şekilde seçilmesi amaçlanmış olup bu doğrultuda seçilen genotiplerde kahverengi pasa dayanıklılığın morfolojik ve moleküler karakterizasyonu belirlenmiştir. Çalışmada incelenen ekmeklik buğday F₂ hatlarında doğal koşullarda yapılan hastalık gözlemleri ve SSR markırların kullanılması sonucunda elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

4.1. Doğal Koşullar Altında Kahverengi Pasa Dayanıklılık

Melez popülasyonlarda F₂ bitkilerinde kahverengi pas hastalık okumalarında Modifiye edilmiş Cobb skalası kullanılmış ve yapılan değerlendirmede ekmeklik buğday genotiplerinin hastalığa karşı farklı tepkiler gösterdiği gözlenmiştir.

Çizelge 4.1. Ekmeklik buğday genotiplerinde hastalık okumaları sonucu dayanıklılık değerleri

Melez Hatları	Hastalık	Melez F ₂ Hatları	Hastalık	Melez Hatları	Hastalık
Pehlivan/ <i>Lr 9</i>	5MR	F85/ <i>Lr 9</i>	10 R	Sana/ <i>Lr 9</i>	10 R
Pehlivan/ <i>Lr 14</i>	10S	F85/ <i>Lr 14</i>	10S	Sana / <i>Lr 14</i>	10S
Pehlivan/ <i>Lr 19</i>	10S	F85/ <i>Lr 19</i>	10S	Sana / <i>Lr 19</i>	10S
Pehlivan/ <i>Lr 22</i>	10S	F85/ <i>Lr 22</i>	10S	Sana / <i>Lr 22</i>	10S
Pehlivan/ <i>Lr 24</i>	5MR	F85/ <i>Lr 24</i>	5MR	Sana / <i>Lr 24</i>	5MR
Pehlivan/ <i>Lr 34</i>	10MS	F85/ <i>Lr 34</i>	10MS	Sana / <i>Lr 34</i>	5 MS
Saban/ <i>Lr 9</i>	10 R	Gelibolu/ <i>Lr 9</i>	10 R	Tina/ <i>Lr 9</i>	10 R
Saban/ <i>Lr 14</i>	10S	Gelibolu/ <i>Lr 14</i>	10S	Tina / <i>Lr 14</i>	10S
Saban/ <i>Lr 19</i>	10S	Gelibolu/ <i>Lr 19</i>	10S	Tina / <i>Lr 19</i>	10S
Saban/ <i>Lr 22</i>	10S	Gelibolu/ <i>Lr 22</i>	10S	Tina / <i>Lr 22</i>	10S
Saban/ <i>Lr 24</i>	5MS	Gelibolu/ <i>Lr 24</i>	5MR	Tina / <i>Lr 24</i>	10MR
Saban/ <i>Lr 34</i>	10MS	Gelibolu/ <i>Lr 34</i>	10S	Tina / <i>Lr 34</i>	10S
Tekirdağ/ <i>Lr 9</i>	10 R	Nina/ <i>Lr 9</i>	10 R	Kate A-1/ <i>Lr 9</i>	10 R
Tekirdağ / <i>Lr 14</i>	10S	Nina/ <i>Lr 14</i>	10S	Kate A-1/ <i>Lr 14</i>	10S
Tekirdağ / <i>Lr 19</i>	10S	Nina/ <i>Lr 19</i>	10S	Kate A-1/ <i>Lr 19</i>	10S
Tekirdağ / <i>Lr 22</i>	10S	Nina/ <i>Lr 22</i>	10S	Kate A-1/ <i>Lr 22</i>	10S
Tekirdağ / <i>Lr 24</i>	10MR	Nina/ <i>Lr 24</i>	5MR	Kate A-1/ <i>Lr 24</i>	10MR
Tekirdağ / <i>Lr 34</i>	10S	Nina/ <i>Lr 34</i>	10S	Kate A-1/ <i>Lr 34</i>	10S

Pehlivan	10S	Sana	5MR	Saban	10S
Tina	5MS	Tekirdağ	10S	Nina	10MR
Morocco	30S	Gelibolu	10S	Kate A-1	10MS
Cumhuriyet	10S	Flamura-85	5S		

Tarla koşullarında yapılan okumalarda Pehlivan çeşidi ile 6 izogenik hat arasında yapılan melez populasyonlarında sadece Pehlivan/*Lr 9* ve *Lr 24* melezleri R ya da MR grubunda dayanıklılık göstermiştir. *Lr 22* izogenik hattı ile yapılan melezlerde ise *Lr 22* geni taşıyan genotipler bulunmamıştır. Pehlivan/*Lr 14*, *19* ve *34* melez döllerinde ise dayanıklılık genleri bulunmakla birlikte hastalık okumaları S düzeyinde yüksek olmuştur.

Saban çeşidi ile 6 izogenik hat arasında yapılan melez populasyonlarında sadece Pehlivan/*Lr 9* melezleri R ya da MR grubunda dayanıklılık göstermiştir. *Lr 22* izogenik hattı ile yapılan melezlerde ise *Lr 22* geni taşıyan genotipler bulunmamıştır. Saban/*Lr 14*, *19*, *24* ve *34* melez döllerinde ise dayanıklılık genleri bulunmakla birlikte hastalık okumaları S ya da MS düzeyinde yüksek olmuştur.

Tekirdağ çeşidi ile 6 izogenik hat arasında yapılan melez populasyonlarında sadece Pehlivan/*Lr 9* ve *Lr 24* melezleri R ya da MR grubunda dayanıklılık göstermiştir. *Lr 22* izogenik hattı ile yapılan melezlerde ise *Lr 22* geni taşıyan genotipler bulunmamıştır. Tekirdağ/*Lr 14*, *19* ve *34* melez döllerinde ise dayanıklılık genleri bulunmakla birlikte hastalık okumaları S düzeyinde yüksek olmuştur.

Flamura-85 ve Tekirdağ çeşitleri ile 6 izogenik hat arasında yapılan melez populasyonlarında sadece Flamura/*Lr 9* ve *Lr 24* melezleri R ya da MR grubunda dayanıklılık göstermiştir. *Lr 22* izogenik hattı ile yapılan melezlerde ise *Lr 22* geni taşıyan genotipler bulunmamıştır. Flamura-85/*Lr 14*, *19* ve *34* melez döllerinde ise dayanıklılık genleri bulunmakla birlikte hastalık okumaları S düzeyinde yüksek olmuştur.

Nina ve Sana çeşitleri kahverengi pasa MR düzeyinde tepki gösterirken 6 izogenik hat arasında yapılan melez populasyonlarında sadece Nina/*Lr 9* ve *Lr 24* melezleri R ya da MR grubunda dayanıklılık göstermiştir. *Lr 22* izogenik hattı ile yapılan melezlerde ise *Lr 22* geni taşıyan genotipler bulunmamıştır. Nina/*Lr 14*, *19* ve *34* melez döllerinde ise dayanıklılık genleri bulunmakla birlikte hastalık okumaları S düzeyinde yüksek olmuştur.

Tina ve Kate A 1 çeşitleri kahverengi pasa MS düzeyinde tepki gösterirken 6 izogenik hat arasında yapılan melez popülasyonlarında sadece Tina/*Lr 9* ve *Lr 24* melezleri R ya da MR grubunda dayanıklılık göstermiştir. *Lr 22* izogenik hattı ile yapılan melezlerde ise *Lr 22* geni taşıyan genotipler bulunmamıştır. Nina/*Lr 14*, *19* ve *34* melez döllerinde ise dayanıklılık genleri bulunmakla birlikte hastalık okumaları S düzeyinde yüksek olmuştur.

Tarla koşullarında yapılan hastalık okumalarına göre ekmeklik buğday çeşitleri ve *Lr 9* ve *Lr 24* izogenik hatları arasındaki tüm melez kombinasyonlarının kahverengi pasa dayanıklılık özelliği gösterdiği belirlenmiştir. Buna karşın bu üç ekmeklik buğday çeşidi ile *Lr 14*, *Lr 19*, *Lr 22* ve *Lr 34* taşıyan izogenik hatlar arasında yapılan melez dölleri ise kahverengi pasa karşı hassas özellik göstermiştir. Elde edilen veriler Trakya Bölgesi için özellikle *Lr 9* ve *Lr 24* dayanıklılık geninin önemli seleksiyon kriteri olduğunu göstermektedir. Ekmeklik buğday çeşitleri ile *Lr 22* geni bulunan izogenik hat arasındaki melez kombinasyonlarda *Lr 22* geninin bulunmaması bu gen yönünden daha ayrıntılı çalışmalar yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır. *Lr 14*, *Lr 19*, ve *Lr 34* kahverengi pasa dayanıklılık genleri Trakya Bölgesi'nde hastalık ırkları yönünden önem taşımamaktadır.

4.2. Moleküler Analizler

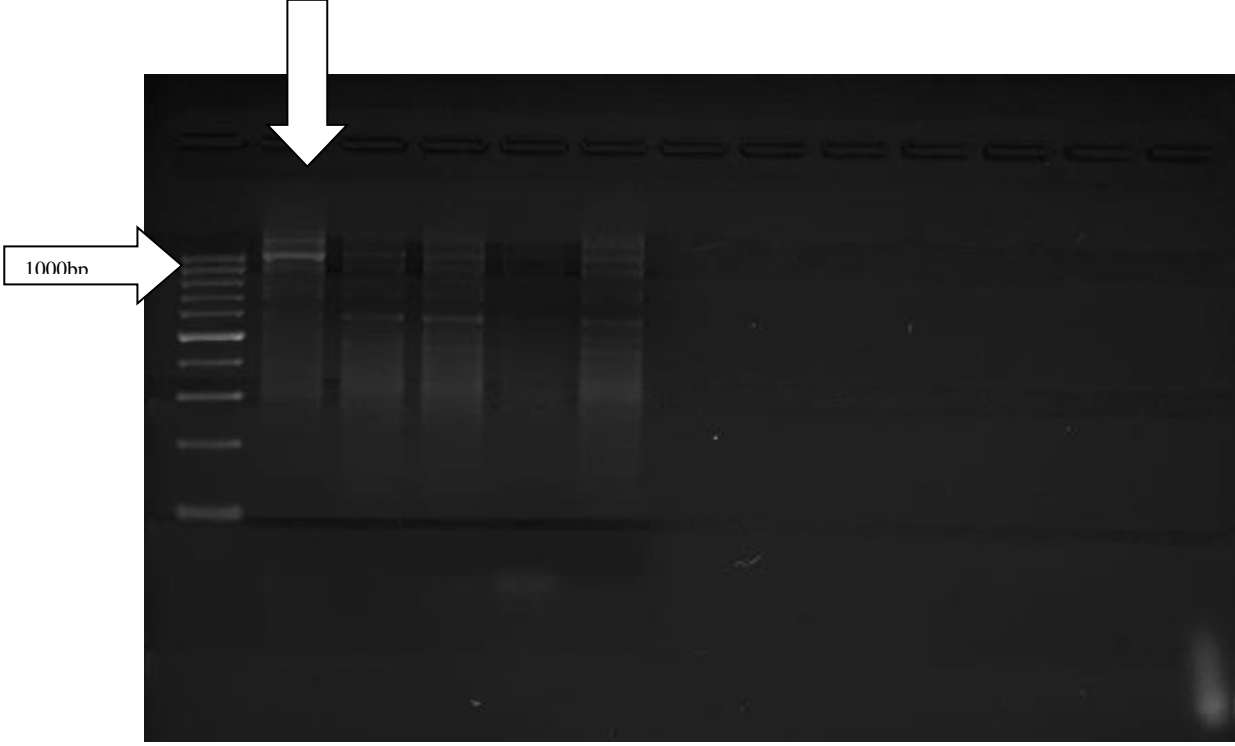
Yapılan çalışmada bölgede yetiştiriciliği yapılan Pehlivan, Saban, Flamura-85 ekmeklik buğday çeşitleri ile *Lr 9*, *Lr 14*, *Lr 19*, *Lr 22*, *Lr 24*, *Lr 34* dayanıklılık genlerini içeren izogenik hatların melezlenmesi sonucu elde edilen F₂ hatlarının *Lr 9*, *Lr 14*, *Lr 19*, *Lr 22*, *Lr 24*, *Lr 34* dayanıklılık genlerini taşıyıp taşımadıkları belirlenmiştir. Çalışmada CIMMYT-Meksika' dan temin edilen izogenik hatlar standart olarak kullanılmıştır.

Lr 9, *Lr 14*, *Lr 19*, *Lr 22*, *Lr 24* ve *Lr 34* olmak üzere kahverengi pas dayanıklılık genlerinin ekmeklik buğday F₂ hatlarında bulunup bulunmadıklarını belirlenmesi ile elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

4.2.1. *Lr 9* Geni İçin Elde Edilen SSR Sonuçları

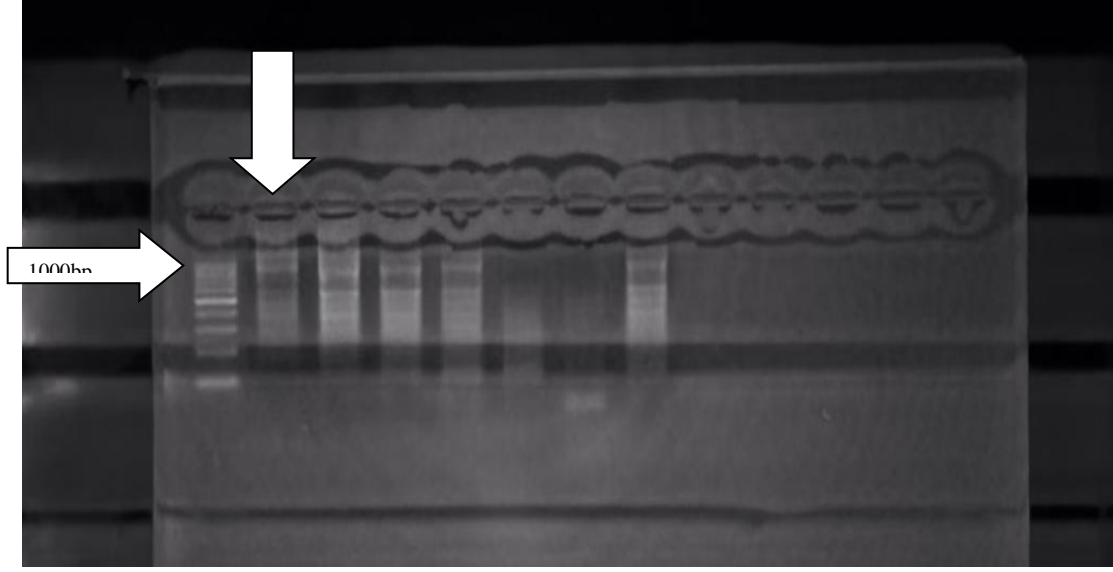
J13 markırı ile yapılan PCR sonuçlarında oluşan DNA fragmentlerinde, literatür araştırmaları sonucu mevcut çalışmalar ile belirlenen ve oluşması gereken baz çifti büyüklüğü

1110 bç' dir. J13 markırı ile yapılan PCR sonuçlarında 1110 bç büyüklünde oluşan DNA fragmentlerine ait genotipler *Lr9* genini taşıyan dayanıklı genotipler olarak belirlenmiştir.



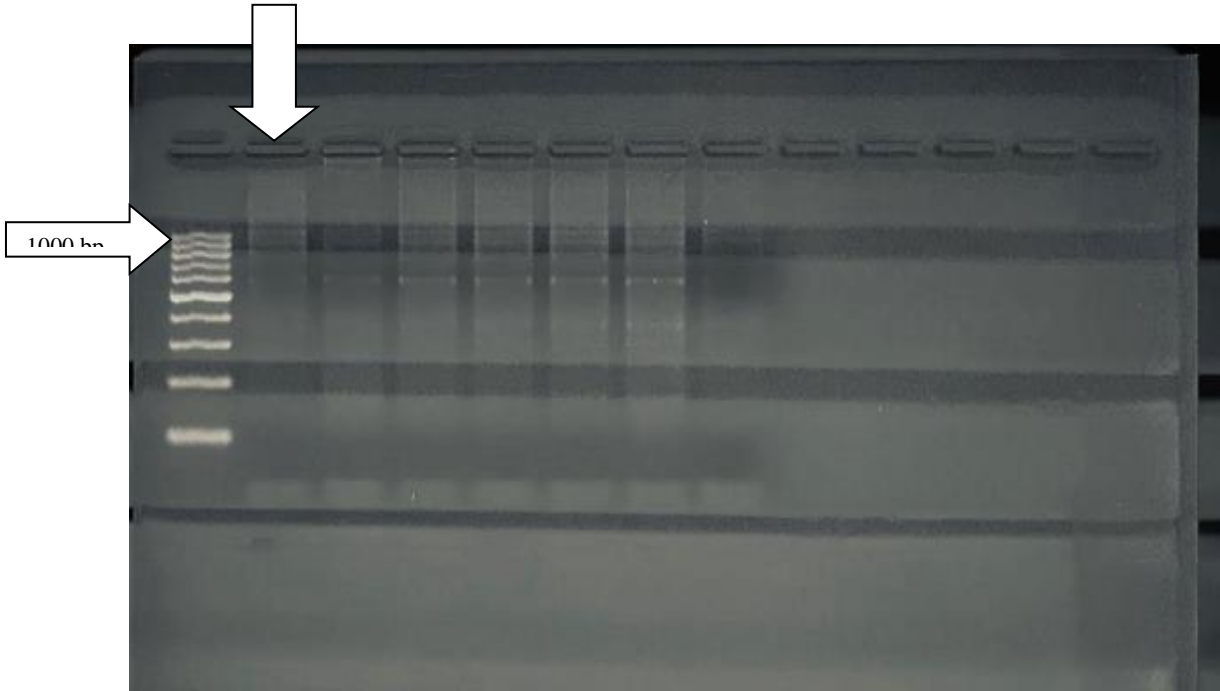
Şekil 4.1. Flamura-85/*Lr 9* F₂ hattına ait *Lr 9* geni için SSR sonuçları

Flamura-85/*Lr 9* hattına ait F₂ döllerinde 4 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 3 bitkinin *Lr 9* genini taşıdığı belirlenmiş olup Flamura-85/*Lr 9* hattının genel olarak *Lr 9* geni için dayanıklı olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. Pehlivan/*Lr 9* F₂ hattına ait *Lr 9* geni için SSR sonuçları

Pehlivan/*Lr 9* hattına ait F₂ döllerinde 6 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 6 bitkide *Lr 9* genini taşıdığı belirlenmiş olup Pehlivan/*Lr 9* hattının *Lr 9* geni için dayanıklı olduğu tespit edilmiştir.

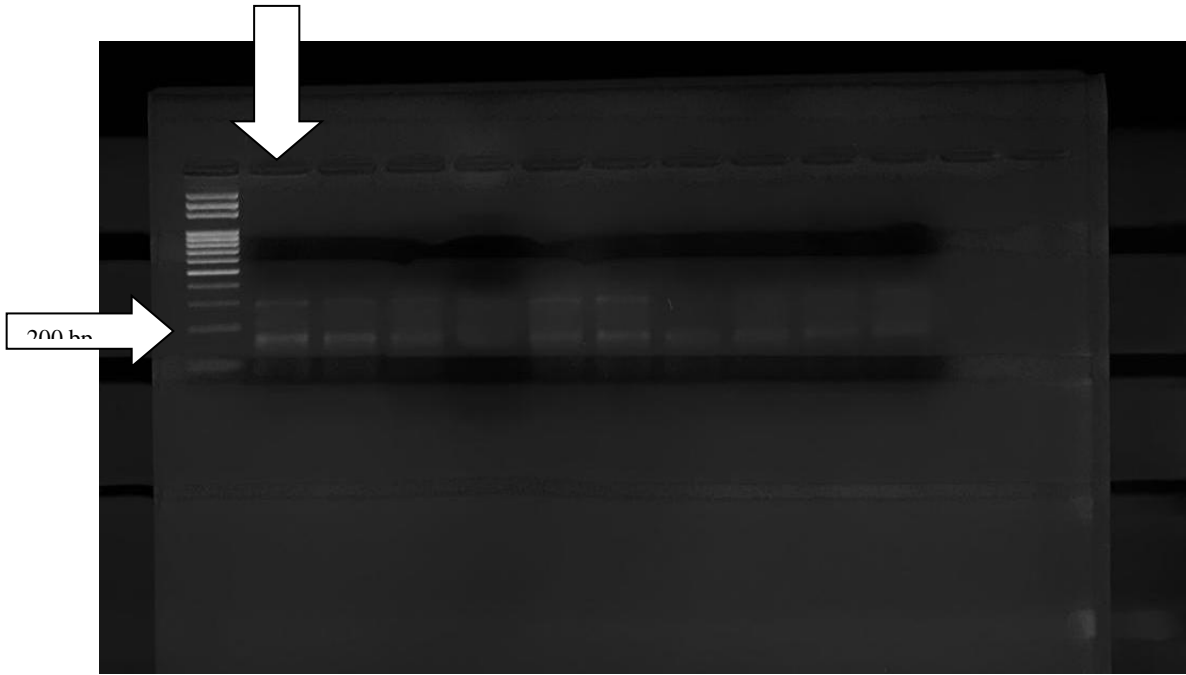


Şekil 4.3. Saban/*Lr 9* F₂ hattına ait *Lr 9* geni için SSR sonuçları

Saban /*Lr 9* hattına ait F₂ dölllerinde 6 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 6 bitkinin de *Lr 9* genini taşıdığı belirlenmiş olup Saban/*Lr 9* hattının *Lr 9* geni için dayanıklı olduğu tespit edilmiştir.

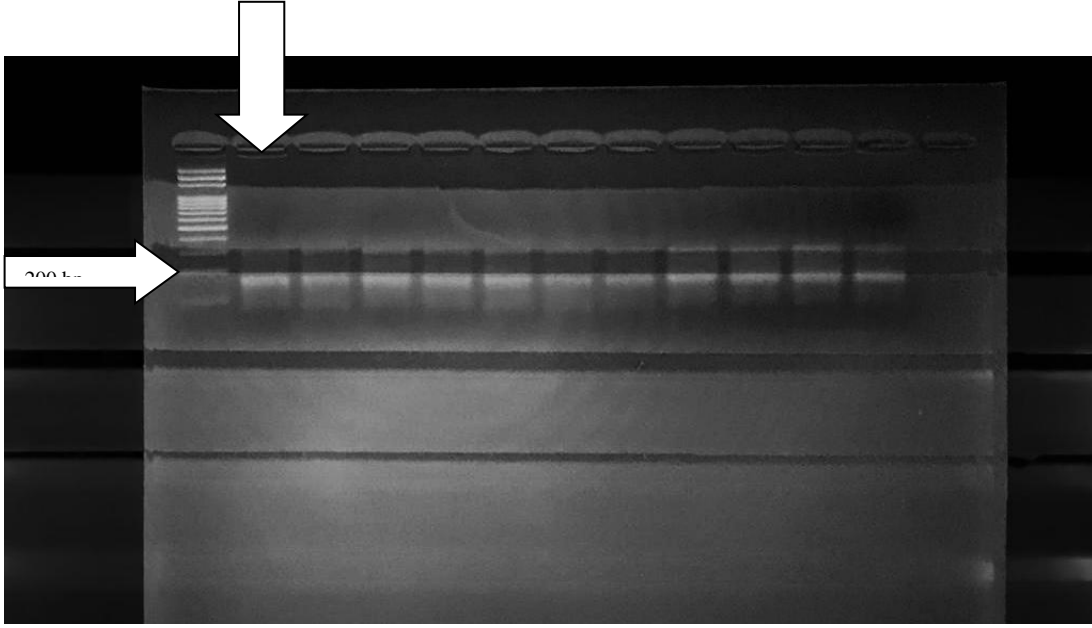
4.2.2. *Lr 14* Geni İçin Elde Edilen SSR Sonuçları

Xgwm146 markırı ile yapılan PCR sonuçlarında oluşan DNA fragmentlerinde, literatür araştırmaları sonucu mevcut çalışmalar ile belirlenen ve oluşması gereken baz çifti büyüklüğü 174 bp' dir. Xgwm146 markırı ile yapılan PCR sonuçlarında 174 bp büyüklünde oluşan DNA fragmentlerine ait genotipler *Lr 14* genini taşıyan dayanıklı genotipler olarak belirlenmiştir.



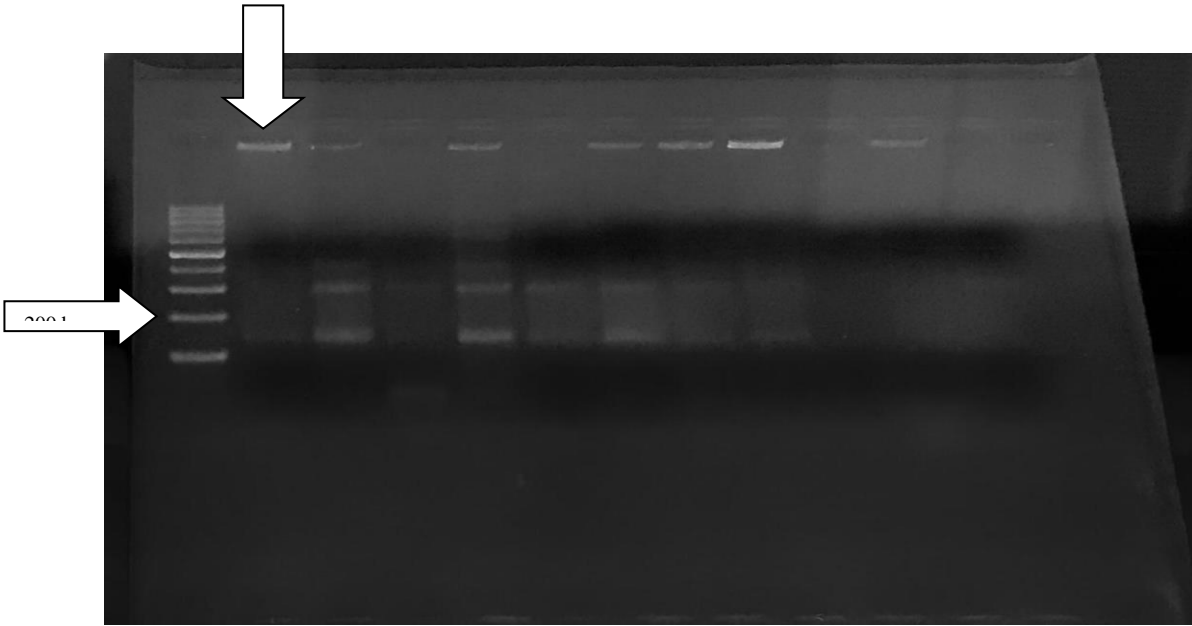
Şekil 4.4. Flamura-85/*Lr 14* F₂ hattına ait *Lr 14* geni için SSR sonuçları

Flamura-85/*Lr 14* hattına ait F₂ dölllerinde 9 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 9 bitkinin de *Lr 14* genini taşıdığı belirlenmiş olup Flamura-85/*Lr 14* hattının *Lr 14* geni için dayanıklı olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. Pehlivan/*Lr 14* F₂ hattına ait *Lr 14* geni için SSR sonuçları

Pehlivan/*Lr 14* hattına ait F₂ döllerinde 10 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 10 bitkinin de *Lr 14* genini taşıdığı belirlenmiş olup Pehlivan/*Lr 14* hattının *Lr 14* geni için dayanıklı olduğu tespit edilmiştir.

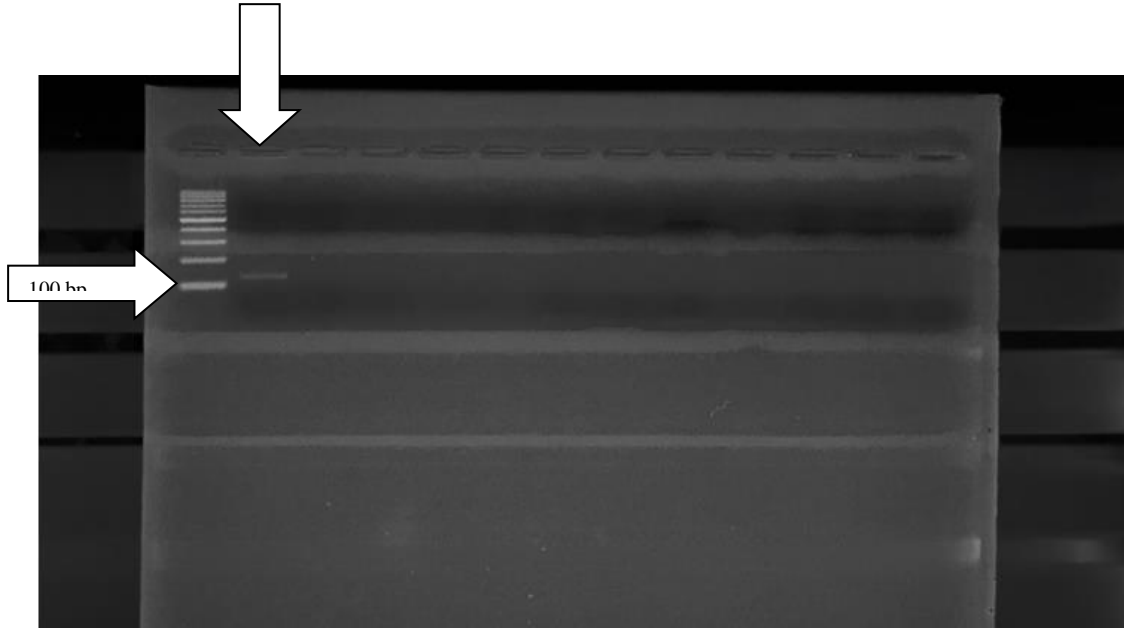


Şekil 4.6. Saban/*Lr 14* F₂ hattına ait *Lr 14* geni için SSR sonuçları

Saban/*Lr 14* hattına ait F₂ dölllerinde 10 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 6 bitkinin *Lr 14* genini taşıdığı belirlenmiş olup Saban/*Lr 14* hattının *Lr 14* geni için dayanıklı olduğu tespit edilmiştir.

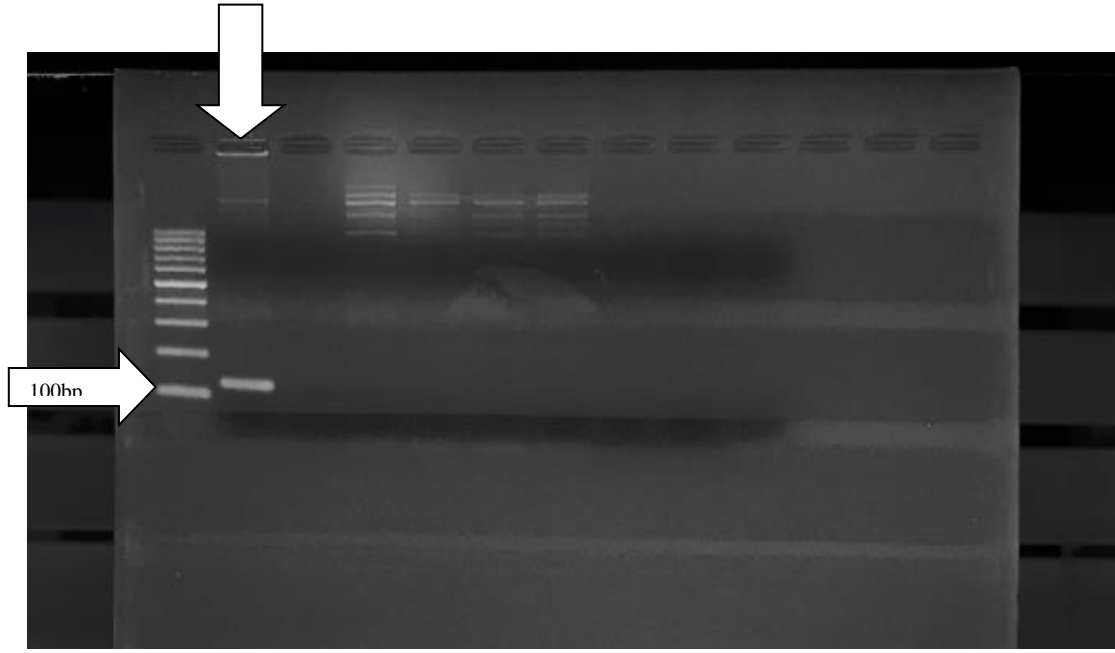
4.2.3. *Lr 19* Geni İçin Elde Edilen SSR Sonuçları

Gb markırı ile yapılan PCR sonuçlarında oluşan DNA fragmentlerinde, literatür araştırmaları sonucu mevcut çalışmalar ile belirlenen ve oluşması gereken baz çifti büyüklüğü 130 bç' dir. Gb markırı ile yapılan PCR sonuçlarında 130 bç büyüklünde oluşan DNA fragmentlerine ait genotipler *Lr 19* genini taşıyan dayanıklı genotipler olarak belirlenmiştir.



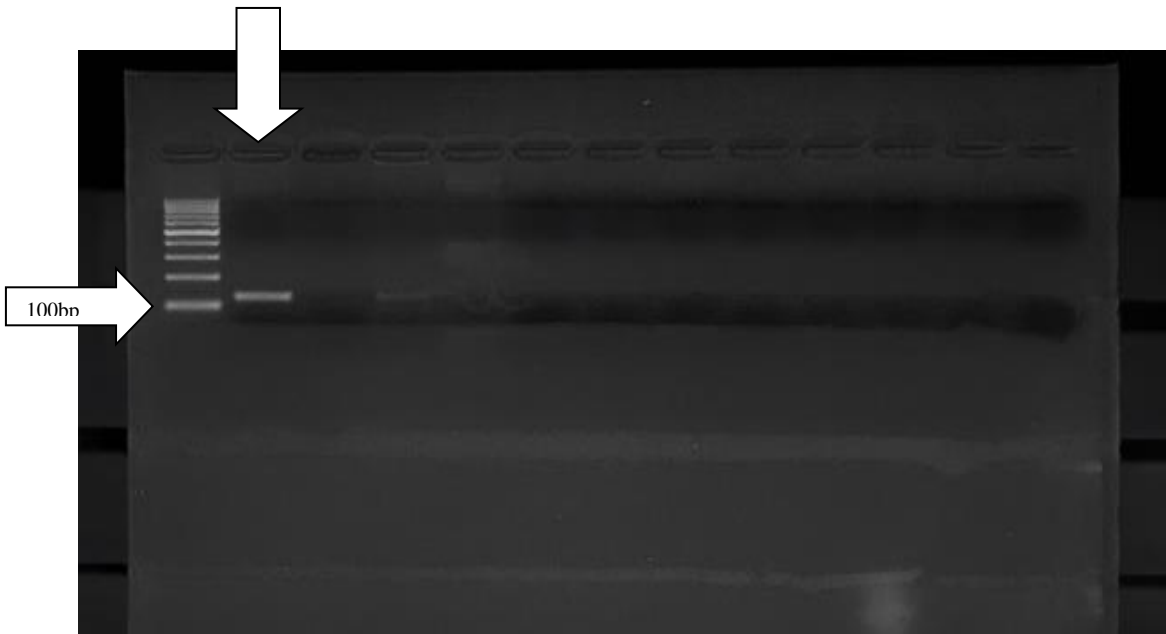
Şekil 4.7. Flamura-85/*Lr 19* F₂ hattına ait *Lr 19* geni için SSR sonuçları

Flamura-85/*Lr 19* hattına ait F₂ dölllerinde 10 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 10 bitkinin de *Lr 19* genini taşımadığı belirlenmiş olup Flamura-85/*Lr 19* hattının *Lr 19* geni için dayanıklı olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.8. Pehlivan/*Lr 19* F₂ hattına ait *Lr 19* geni için SSR sonuçları

Pehlivan/*Lr 19* hattına ait F₂ döllerinde 10 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 10 bitkinin de *Lr 19* genini taşımadığı belirlenmiş olup Pehlivan/*Lr 19* hattının *Lr 19* geni için dayanıklı olmadığı tespit edilmiştir.

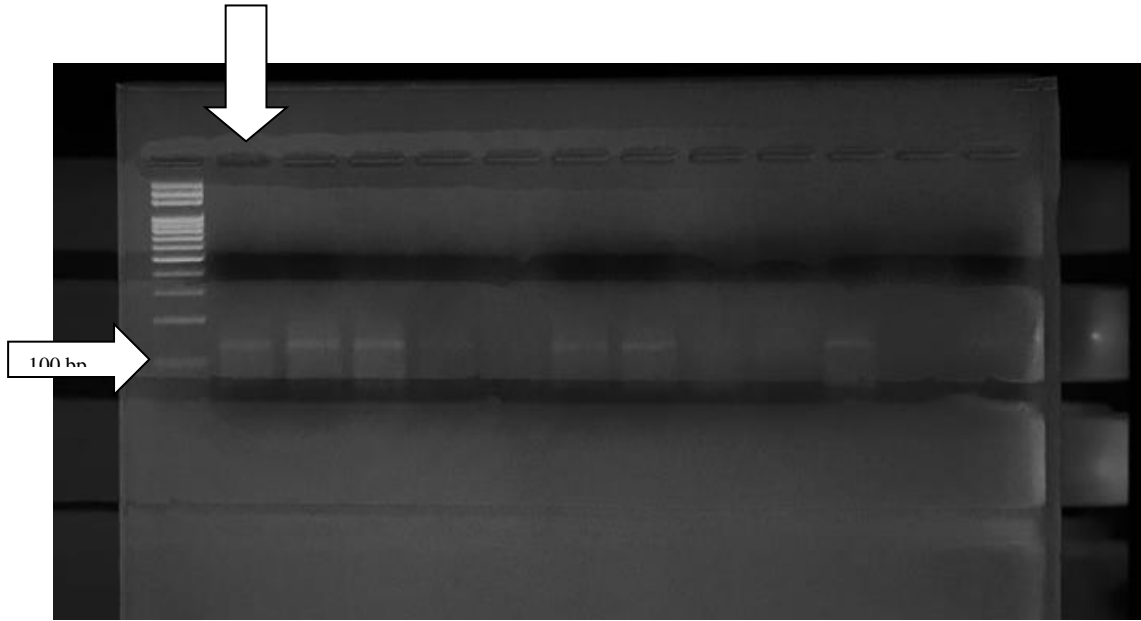


Şekil 4.9. Saban/*Lr 19* F₂ hattına ait *Lr 19* geni için SSR sonuçları

Saban/*Lr 19* hattına ait F_2 dölllerinde 10 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 9 bitkinin *Lr 19* genini taşımadığı belirlenmiş olup Saban/*Lr 19* hattının *Lr 19* geni için dayanıklı olmadığı tespit edilmiştir.

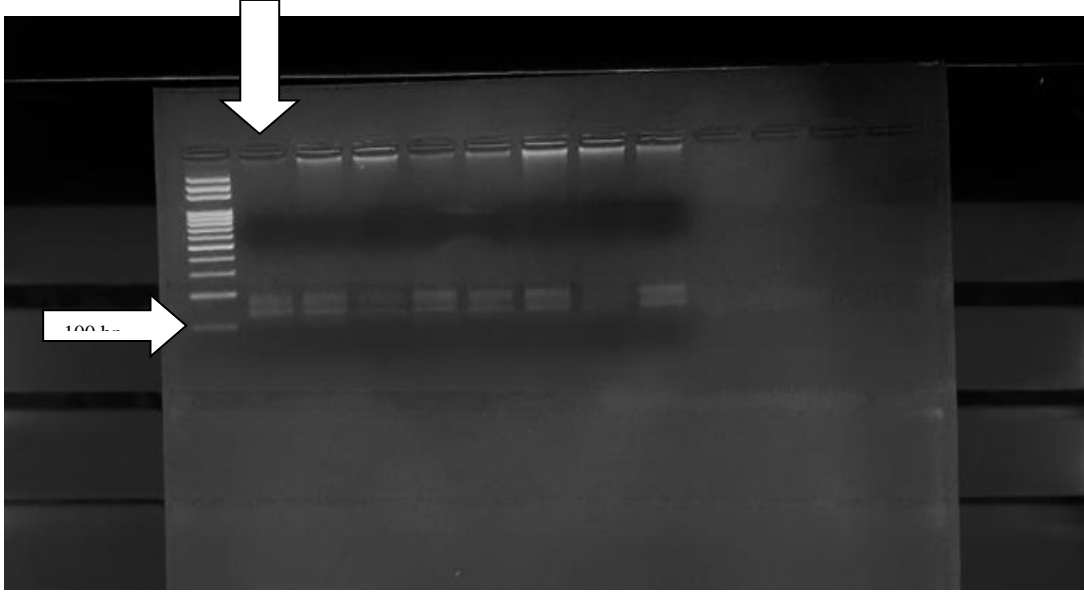
4.2.4. *Lr 22* Geni İçin Elde Edilen SSR Sonuçları

Xgwm296 markırı ile yapılan PCR sonuçlarında oluşan DNA fragmentlerinde, literatür araştırmaları sonucu mevcut çalışmalar ile belirlenen ve oluşması gereken baz çifti büyüklüğü 120-130 bç' dir. Xgwm296 markırı ile yapılan PCR sonuçlarında 120-130 bç büyüklünde oluşan DNA fragmentlerine ait genotipler *Lr 22* genini taşıyan dayanıklı genotipler olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.10. Flamura-85/*Lr 22* F_2 hattına ait *Lr 22* geni için SSR sonuçları

Flamura-85/*Lr 22* hattına ait F_2 dölllerinde 10 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 5 bitkinin *Lr 22* genini taşıdığı belirlenmiş olup Flamura-85/*Lr 22* hattının *Lr 22* geni için dayanıklı olduğu tespit edilmiştir.

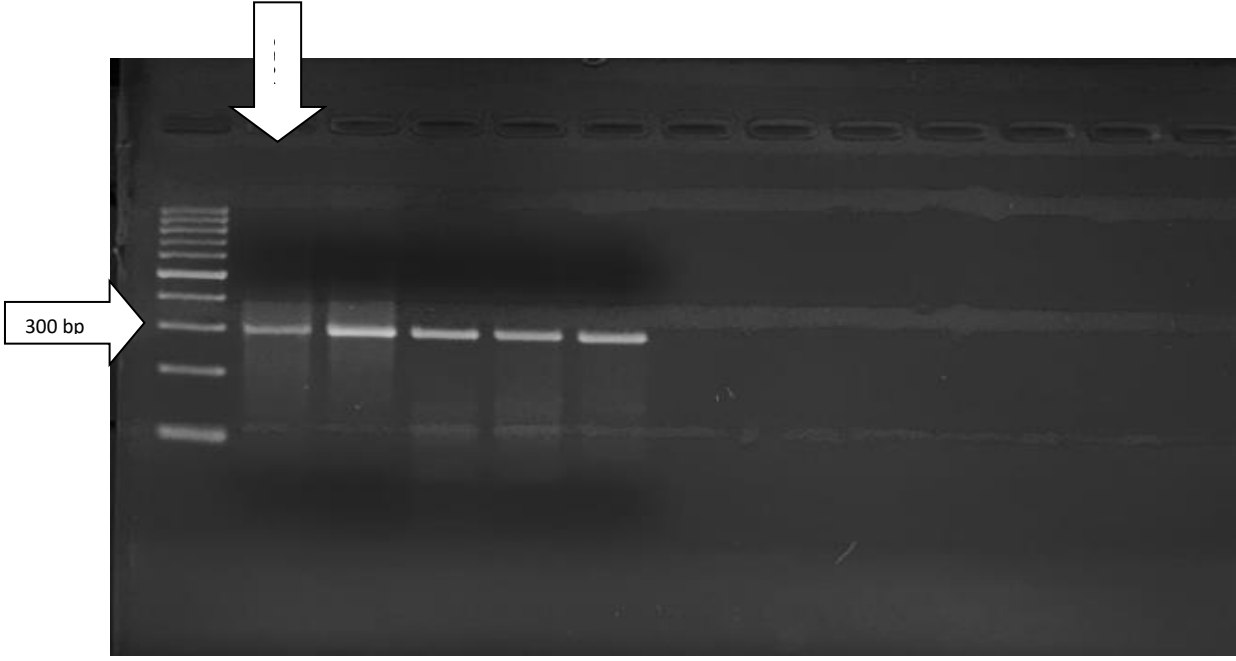


Şekil 4.11. Saban/*Lr 22* F₂ hattına ait *Lr 22* geni için SSR sonuçları

Saban/*Lr 22* hattına ait F₂ dölllerinde 7 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 6 bitkinin *Lr 22* genini taşıdığı belirlenmiş olup Saban/*Lr 22* hattının *Lr 22* geni için dayanıklı olduğu tespit edilmiştir.

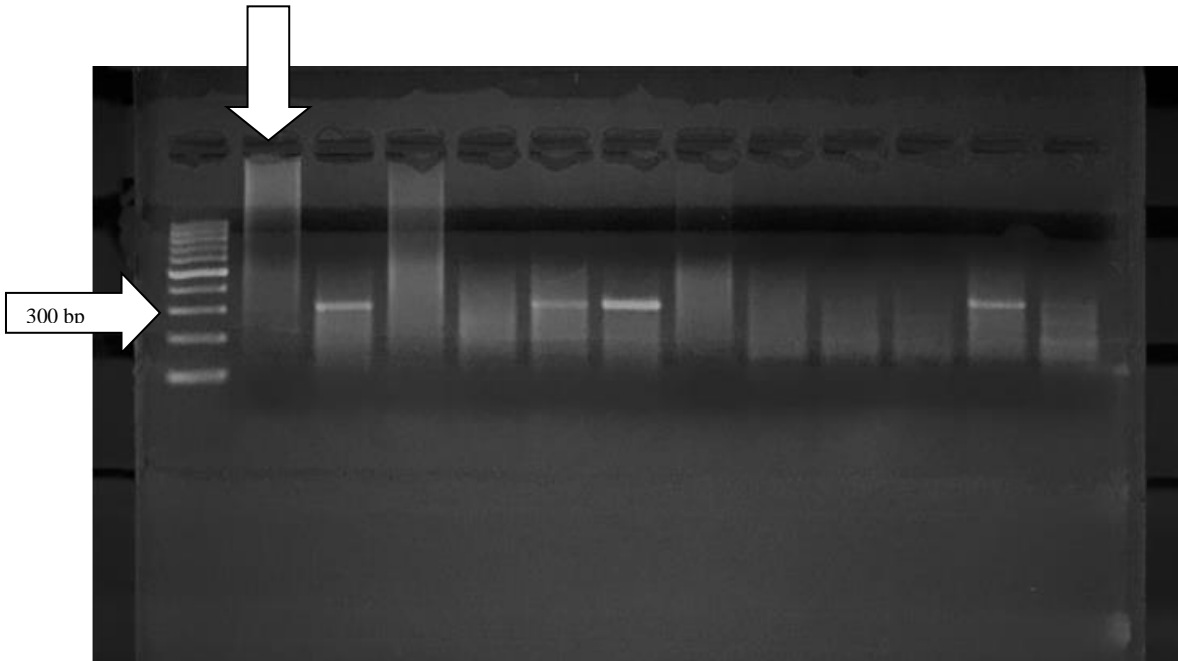
4.2.5. *Lr 24* Geni İçin Elde Edilen SSR Sonuçları

J09 markırı ile yapılan PCR sonuçlarında oluşan DNA fragmentlerinde, literatür araştırmaları sonucu mevcut çalışmalar ile belirlenen ve oluşması gereken baz çifti büyüklüğü 350 bç' dir. J09 markırı ile yapılan PCR sonuçlarında 350 bç büyüklünde oluşan DNA fragmentlerine ait genotipler *Lr 24* genini taşıyan dayanıklı genotipler olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.12. Flamura-85/*Lr 24* F₂ hattına ait *Lr 24* geni için SSR sonuçları

Flamura-85/*Lr 24* hattına ait F₂ dölllerinde 4 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 4 bitkinin de *Lr 24* genini taşıdığı belirlenmiş olup Flamura-85/*Lr 24* hattının *Lr 24* geni için dayanıklı olduğu tespit edilmiştir.

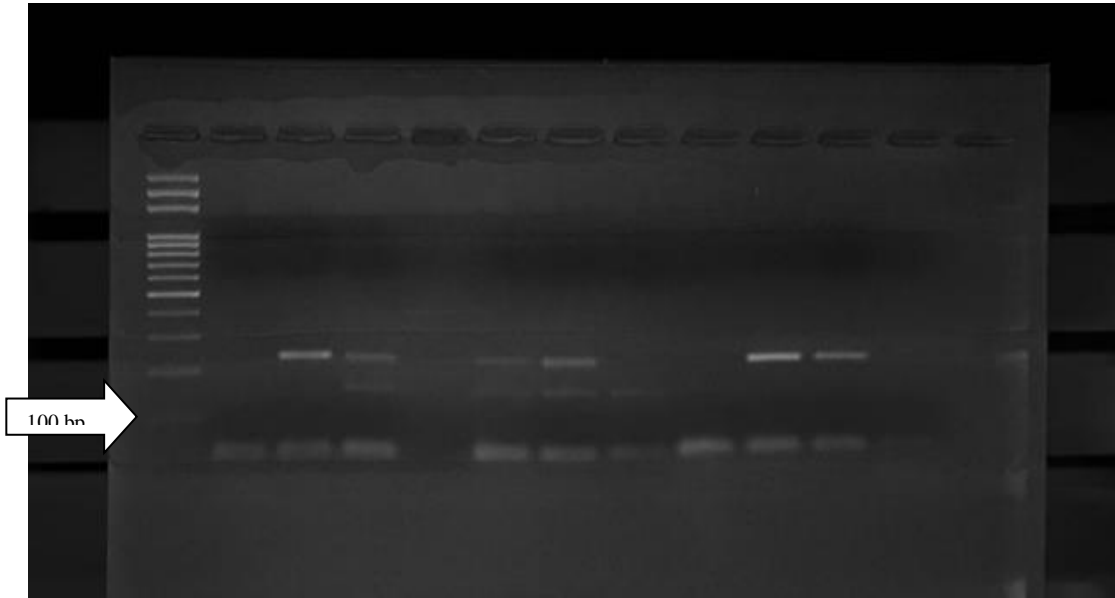


Şekil 4.13. Saban/*Lr 24* F₂ hattına ait *Lr 24* geni için SSR sonuçları

Saban/*Lr 24* hattına ait F₂ dölllerinde 11 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 4 bitkinin *Lr 24* genini taşıdığı belirlenmiş olup Flamura-85/*Lr 24* hattının *Lr 24* geni için dayanıklı olduğu tespit edilmiştir

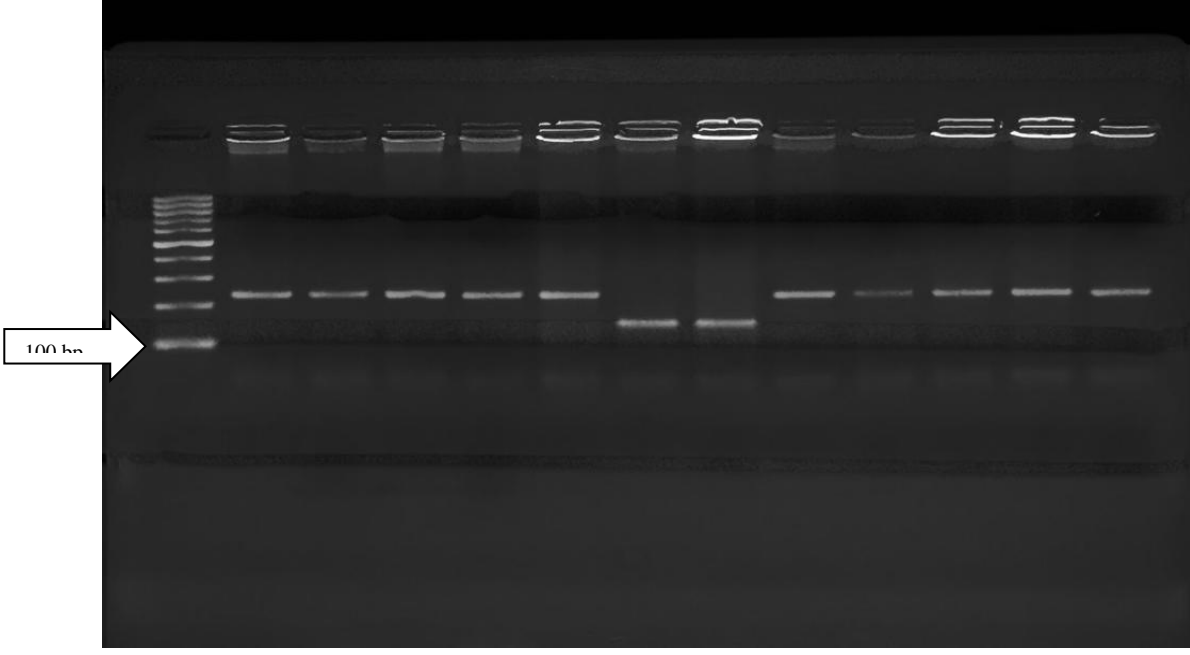
4.2.6. *Lr 34* Geni İçin Elde Edilen SSR Sonuçları

cSLV34 markırı ile yapılan PCR sonuçlarında oluşan DNA fragmentlerinde, literatür araştırmaları sonucu mevcut çalışmalar ile belirlenen ve oluşması gereken baz çifti büyüklüğü 150 bç' dir. cSLV34 markırı ile yapılan PCR sonuçlarında 150 bç büyüklünde oluşan DNA fragmentlerine ait genotipler *Lr 34* genini taşıyan dayanıklı genotipler olarak belirlenmiştir.



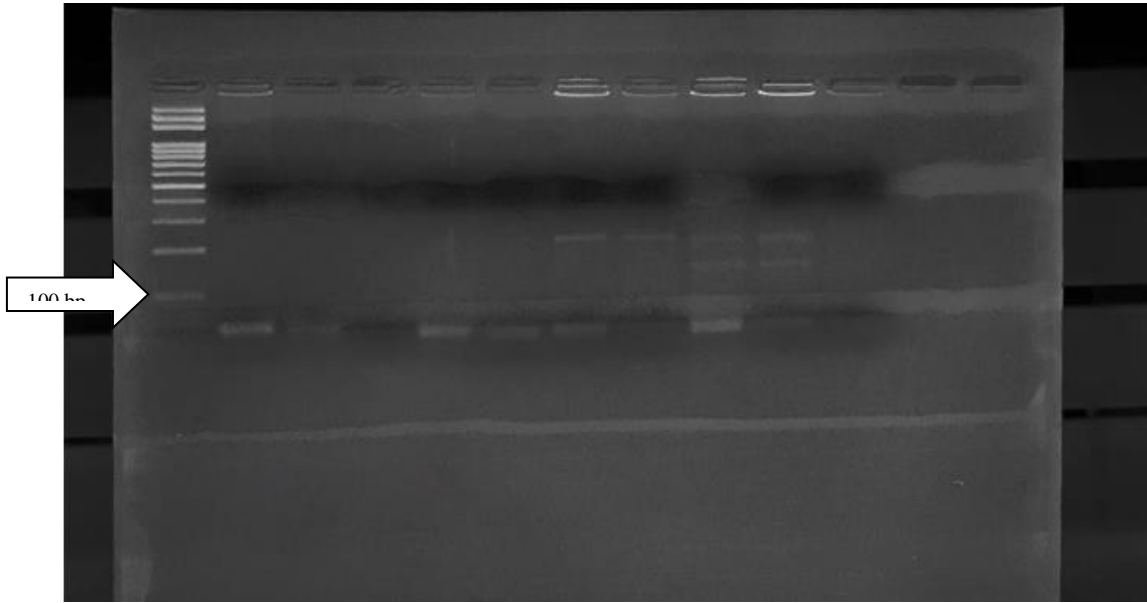
Şekil 4.14. Flamura-85/*Lr 34* F₂ hattına ait *Lr 34* geni için SSR sonuçları

Flamura-85/*Lr 34* hattına ait F₂ dölllerinde 10 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 4 bitkinin *Lr 34* genini taşıdığı belirlenmiş olup Flamura-85/*Lr 34* hattının *Lr 34* geni için dayanıklı olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.15. Pehlivan/*Lr 34* F₂ hattına ait *Lr 34* geni için SSR sonuçları

Pehlivan/*Lr 34* hattına ait F₂ döllerinde 11 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 2 bitkinin *Lr 34* genini taşıdığı belirlenmiş olup Pehlivan/*Lr 34* hattının *Lr 34* geni için dayanıklı olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.16. Saban/*Lr 34* F₂ hattına ait *Lr 34* geni için SSR sonuçları

Saban/*Lr 34* hattına ait F₂ dölllerinde 9 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 2 bitkinin *Lr 34* genini taşıdığı belirlenmiş olup Saban/*Lr 34* hattının *Lr 34* geni için dayanıklı olduğu tespit edilmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırma, 2016-2017 yetiştirme döneminde Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Deneme Alanı'nda tesadüf blokları deneme desenine göre yürütülmüştür. 2016 yılında ekimi yapılan Pehlivan, Sana, Tina, Tekirdağ, Gelibolu, Nina, F-85, Saban, Kate A-1 buğday genotiplerine *Lr 9*, *Lr 14*, *Lr 19*, *Lr 22*, *Lr 24*, *Lr 34* kahverengi pas dayanıklılık genlerini içeren izogenik hatlardan baba olarak kullanılarak melezleme yapılmıştır.

Araştırmada ekmeklik buğday genotipleri, *Lr* genleri içeren izogenik hatlar ve bunların melezlenmesi sonucu elde edilen F₂ populasyonları hastalık değerlendirmeleri 2 dönemde (erken- geç) Modifiye edilmiş Cobb skalası (Peterson et al. 1948) baz alınarak yapılmıştır.

Kahverengi pasa dayanıklılığın moleküler karakterizasyonunu belirlemek amacıyla Basit Dizi Tekrarları (SSR) analizleri kullanılarak Pehlivan, Saban, F85 ekmeklik buğday genotipleri ve *Lr 9*, *Lr 14*, *Lr 19*, *Lr 22*, *Lr 24* ve *Lr 34* dayanıklılık genleri içeren izogenik hatlar ile melezlenmesi sonucu elde edilen F₂ populasyonlarının moleküler tanımlamaları yapılmış ve genotipik farklılıkları belirlenmiştir.

Flamura-85/*Lr 9* hattına ait F₂ döllerinde 4 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 3 bitkinin *Lr 9* genini taşıdığı, Pehlivan/*Lr 9* ve Saban/*Lr 9* hattına ait F₂ döllerinde 6 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda tüm bitkilerin *Lr 9* genini taşıdığı belirlenmiştir.

Flamura-85/*Lr14* hattına ait F₂ döllerinde 9 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 9 bitkinin de *Lr 14* genini taşıdığı, Pehlivan/*Lr 14* hattına ait F₂ döllerinde 10 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 10 bitkinin de *Lr 14* genini taşıdığı belirlenmiştir. Saban/*Lr 14* hattına ait F₂ döllerinde 10 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda ise 6 bitkinin *Lr14* genini taşıdığı belirlenmiştir.

Flamura-85/*Lr 19* hattına ait F₂ döllerinde 10 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 10 bitkinin, Pehlivan/*Lr 19* hattına ait F₂ döllerinde 10 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 10 bitkinin, Saban/*Lr 19* hattına ait F₂ döllerinde 10 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 9 bitkinin de *Lr 19* genini taşımadığı belirlenmiştir.

Flamura-85/*Lr 22* hattına ait F_2 dölllerinde 10 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 5 bitkinin *Lr 22* genini taşıdığı, Saban/*Lr 22* hattına ait F_2 dölllerinde 7 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 6 bitkinin *Lr 22* genini taşıdığı belirlenmiştir.

Flamura-85/*Lr 24* hattına ait F_2 dölllerinde 4 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 4 bitkinin de *Lr 24* genini taşıdığı, Saban/*Lr 24* hattına ait F_2 dölllerinde 11 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 4 bitkinin *Lr 24* genini taşıdığı belirlenmiştir.

Flamura-85/*Lr 34* hattına ait F_2 dölllerinde 10 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 4 bitkinin *Lr 34* genini taşıdığı, Pehlivan/*Lr 34* hattına ait F_2 dölllerinde 11 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 2 bitkinin *Lr 34* genini taşıdığı, Saban/*Lr 34* hattına ait F_2 dölllerinde 9 farklı bitkiden oluşturulan örneklerde elde edilen jel görüntüleri sonucunda 2 bitkinin *Lr 34* genini taşıdığı belirlenmiştir.

Elde edilen veriler ekmeklik buğday genotipleri ile izogenik hatlar arasında yapılan melezlemeler sonucunda *Lr 9* genini taşıdıkları, Flamura 85 ve Pehlivan çeşidi ile *Lr 14* taşıyan izogenik hatların melezinde tüm bitkiler *Lr 14* genini taşıırken Saban melezinde bu % 60 oranında görülmüştür. *Lr 19* taşıyan izogenik hat ile melezlemede 3 çeşidin tüm F_2 bitkilerinde *Lr 19* geni bulunmamıştır. *Lr 22* izogenik hattı ile yapılan melezlemelerde Flamura-85 melezinde % 50, Saban melezinde ise % 86 oranında aktarılmıştır. *Lr 24* taşıyan izogenik hat ile 3 ekmeklik buğday çeşidi arasında yapılan melezlemelerde Flamura-85 melezinin tümünün, Saban melez bitkilerinin ise % 36 oranında taşıdıkları belirlenmiştir. *Lr 34* bulunan izogenik hat ve 3 buğday çeşidi melezinde Flamura-85 melezinin % 40 oranında, Pehlivan melezinin % 18 oranında ve Saban melezinde ise % 22 oranında taşıdıkları belirlenmiştir.

6. KAYNAKLAR

- Abdelbacki A., Soliman N., Najeeb M., Omara R. (2013), Postulation and İdentification of Resistance Genes Against *Puccinia Triticina* in New Wheat Cultivars in Egypt Using Molecular Markers, International Journal of Chemical, Environmental & Biological Sciences (IJCEBS) Volume 1, Issue 1.
- Akın B., Zencirci N., Özseven İ. (2008), Farklı Ülkelerde Geliştirilmiş Buğday (*Triticum aestivum* L.) Genotiplerinin Kahverengi Pasa (*Puccinia triticina*) Karşı Tarla Dayanıklılık Düzeyleri, Turk J Agric For 32, 479-486.
- Altay F. (1980), Kahverengi Pasa Mukavemet Kaynakları ve Islahı, Bitki Islahı Simpozyumu, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Yayınları, NO:17/41, Menemen-İzmir 240-217.
- Arslan Ü., Yağdı K., Aydoğan E. (2002), Bursa İli Ekolojik Koşullarında Buğday Kahverengi Pası (*Puccinia recondita* Roberge ex Desmaz. f.sp.*tritici*)'na Karşı Bazı Ekmeklik Buğdayların Reaksiyonları ve Verim Kayıplarının Belirlenmesi, Ulud. Üniv. Zir. Fak. Derg., (2002) 16: 201-210.
- Ay H. (2013), Çukurova Koşullarında Pas Hastalıklarının Bazı Ekmeklik Buğday Çeşitlerine Etkisi, Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi 6 (1): 50-55, ISSN: 1308-3945
- Aybeke M. (2015), Screening of Lr Genes Providing Resistance To Leaf Rust In Wheat Using Multiplex Pcr Method, Trakya University Journal of Natural Sciences, 16(1): 45-49, 2015 ISSN 2147-0294
- Aykut F (2007), Buğdayda Kahverengi Pasa Dayanıklılık Genleri İle İlgili Moleküler Markörler Üzerinde Alıştırmalar, Doktora Tezi, Ege Üniv. Fen Bil. Enst. İzmir.
- Botstein D., White R., Skolnick M., Davis R. (1980), Construction of A Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms, Amer. J. Human Genet., 32:314-331.
- Charpe A., Koul S., Gupta S. K., Singh A., Pallavi J. V., Prabhu K. V. (2012), Marker Assisted Gene Pyramiding of Leaf Rust Resistance Genes LR24, LR28 And LR9 in A Bread Wheat Cultivar HD2329 , National Phytotron Facility, Indian Agricultural Research Institute New Delhi-110012, J. Wheat Res. 4 (1) : 20-28.
- Chester K.S. (1946). The Nature And Prevention of the Cereal Rusts As Exemplified in the Leaf Rust of Wheat. Waltham, MA: *Chronica Botanica*. 169.

- Cristina D., Turcu A.G., Ciuca M. (2015), Molecular Detection of Resistance Genes to Leaf Rust *LR34* and *LR37* in Wheat Germplasm, Agriculture and Agricultural Science Procedia 6 (2015) 533 – 537
- Davoyan E.R., Bespalova L.A., Davoyan R. O., Zubanova Y. S., Mikov D. S., Filobok V. A., Khudokormova J. N. (2014), Use of Molecular Markers in Wheat Breeding for Resistance to Leaf Rust at The Lukyanenko Research Institute of Agriculture, Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii, 2014, Vol. 18, No. 4/1, 732–738.
- Demir L., Orhan Ş., Ozseven İ., Canıgeniş G., Morgounov A., Akın B. (2014), The Effect of Leaf Rust on Grain Yield and on Yield Traits in Spring Bread Wheat Varieties. International Mesopotamia Agriculture Congress, 22-25. Diyarbakır
- Demir L., Orhan Ş., Özseven İ., Canıgeniş G.(2017), Bazı Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) Çeşitlerinin Sakarya Koşullarında Doğal Epidemide Altında Sarı ve Kahverengi Pas Etmenlerine Karşı Reaksiyonlarının Belirlenmesi, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi 2017, 26 (Özel Sayı): 131–137
- Devran Z. (2016), Moleküler İşaretleyicilerin Dayanıklılık Islahında Kullanılması, Derim 20 (1), 1-6
- Draz I.S., Elseoud M.S.A., Kamara A.E.M., Alaa-Eldein O.A., El-Bebany A.F. (2015), Screening of Wheat Genotypes For Leaf Rust Resistance Along With Grain Yield, Annals of Agricultural Science 60(1), 29–39
- Elyasi-Gomari S. ve Panteleev V. K. (2006), Virulence Polymorphism Of *Puccinia Recondita* F. Sp. *Tritici* And Effectiveness Of LR Genes For Leaf Rust Resistance Of Wheat In Ukraine, Plant Disease 90:853-857.
- Francia E., Rizza F., Cattivelli L., Stanca A.M., Galiba G., Toth B., Hayes P.M., Skinner J.S., Pecchioni N. (2004), Two Loci on Chromosome 5H Determine Low-Temperature Tolerance in a ‘Nure’ (winter) x ‘Tremois’ (spring) Barley Map, Theor. Appl. Genet. 108: 670-680.
- Francia E., Tacconi G., Crosatti C., Barabaschi D., Bulgarelli D., Dall’Aglio E., Valè G. (2005), Marker Assisted Selection in Crop Plants Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 82, 317-342.

- Frankel O.H. (1972), The Significance, Utilization and Conservation of Crop Genetic Resources, FAO, ROME.
- German S. E. and Kolmer J. A. (1992), Effect of Gene LR34: The Enhancement of Resistant to Leaf Rust of Wheat. *Theor. Appl. Genet.* 84, 97–105.
- Gorash A., Galaev A., Babayants O., Babayants L. (2014), Leaf Rust Resistance of Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Lines Derived from Interspecific Crosses, *Zemdirbyste-Agriculture*, ISSN 1392-3196 vol. 101, 295–30
- Haque A, Shaheen T, Gulzar T, Rahman M. R, Jalal F, Sattar S, Ehsan B, Iqbal Z & Younas M (2014), Study of Rust Resistance Genes in Wheat Germplasm With Dna Markers, *Bioinformation* 10(6): 371-377
- Helentjaris T., King G., Slocum M., Siedenstrang D., Wegman S. (1985), Restriction Fragment Length Polymorphisms As Probes For Plant Diversity and Their Development As Tools For Applied Plant Breeding. *Plant Mol. Biol.* 5:109-118.
- Herdem Z., Doğan M., Yeşilyurt N., Akçı M., Çelenk H., Keskin S., Pasin V., Duman H., Egemen M., Doğan O., Tutar S., Kuzuoğlu E., Odabaşı A. & Koç M. (2002). *Buğday ve Arpa Tarımı*. Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Huang X.Q., Wang L. X., Xu M.X., Röder M.S. (2003), Microsatellite Mapping of The Powdery Mildew Resistance Gene Pm5e In Common Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl. Genet.*, 106, 858-865.
- Huseynova I. M., Guliyeva F. B., Rustamova S. M., Aliyev J. A. (2013), Pcr-Based Molecular Markers Linked To The Leaf Rust Resistance Gene LR19 in Different Bread Wheat Cultivars, *Advances in Biological Chemistry*, 2013, 3, 153-158
- Joshi L.M., Palmer L.T. (1973), Epidemiology of stem, leaf, and stripe rusts of wheat in northern India, *Plant Dis. Rep.*57: 8-12.
- Kılıç G. K. (2017), Buğdayda Kahverengi Pas Dayanıklılık Genlerinin (LR9, LR19 ve LR24) Seleksiyonunda Kullanılacak Moleküler Markırların Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bil. Enst. Edirne
- Kolmer, J.A. (1996), Genetics of resistance to wheat leaf rust. *Annu. Rev. Phytopathol*, 34, 435-455.

- Lipps P.E. (2006), Ohio State University, Extension FactSheet, Plant Pathology, <http://ohioline.osu.edu/ac-fact/0006.html>. 2006.
- Marsalis M. A., Goldberg N. P. (2006), Leaf, Stem And Stripe Rust Diseases of Wheat, New Mexico State University, Guide A-415
- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X.C. (2012), Catalogue of Gene Symbols For Wheat. <http://www.shigen.nig.ac.jp>.
- Messmer M. M., Seyfarth R., Keller M., Schachermayr G., Winzeler M., Zanetti S., Feuillet C., Keller B. (2000), Genetic Analysis of Durable Leaf Rust Resistance In Winter Wheat, Theor. Appl. Genet. 100:419–431.
- Nemli T. (2000), Tarla Bitkileri Hastalıkları, Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Ders Notları, 116 s. Bornova-İzmir.
- Örs E. (2018), Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) Genotiplerinin Kahverengi Pas Hastalığına Dayanıklılığının Doğal Koşullarda Morfolojik Belirlenmesi Ve Moleküler Karakterizasyonu, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bil. Enst., TEKİRDAĞ
- Park R.F. (2007), Stem rust of wheat in Australia, Aus. J. Agril. Res. 58: 558–566.
- Rangwen R., Akkaya M.S., Bhagwar A.A., Lavi U., Cregan P.B. (1995), The Use of Microsatellite DNA Markers For Soybean Genotype Identification. Theor. Appl. Genet. 90:43-48.
- Ridout C.R. ve Donini P. (1999), Use of AFLP In Cereals Research. Trends in Plant Science. 4:76-79.
- Roelfs A.P. (1988), Resistance To Leaf And Stem Rust In Wheat. In Breeding Strategies For Resistance To Rusts of Wheat. (ed. N. W.Simmonds and S. Rajaram), 10–22. CIMMYT, Mexico.
- Roelfs A. P., Singh R. P., Saari E. E. (1992), Rust Diseases of Wheat: Concepts And Methods of Disease Management. Mexico, D.F.: CIMMYT. 81
- Salgado D. J., Rosine E., Paul P.A. (2016), Rust Diseases of Wheat, The Ohio State University Extension

- Sharif M. C., Hamama B., Barakat A.A., Amar K.O. (2016), Identification of Leaf Rust Resistance Genes in Selected Ten Egyptian Bread Wheat Cultivars, International Journal of Biochemistry and Biotechnology ISSN: 2169-3048 Vol. 5 (4), 689-696
- Singh R.P., William H.M., Huerta-Espino J., Rosewarne G. (2004), Wheat rust in Asia: meeting the challenges with old and new technologies. In: New directions for a diverse planet: Proceedings of 4th International Crop Science congress.
- Sohail Y., Shinwari Z.Y., Fayyaz M., Rattu A.U.R., Mumtaz A.S. (2015), A Perspective of Leaf Rust Race Fhprn And Its Impact on Leaf Rust Resistance in Pakistani Wheat Varieties, Pak. J. Bot., 47(4): 1559-1567
- Sönmezoğlu A.Ö., Yıldırım A., Güleç E.T., Kandemir N. (2010), Markör Destekli Seleksiyonun Buğday Islahında Kullanımı, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 27 (1), 105-112
- TMO (2018), Toprak Mahsulleri Ofisi Genel Müdürlüğü. <http://www.tmo.gov.tr>
- TÜİK (2018), Türkiye İstatistik Kurumu. <http://tuik.gov.tr>
- Vanzetti L.S., Campos P., Demichelis M., Lombardo L.A., Aurelia P.R., Vaschetto L.M., Bainotti C.T., Helguera M. (2011), Identification of Leaf Rust Resistance Genes in Selected Argentinean Bread Wheat Cultivars By Gene Postulation And Molecular Markers, Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458
- Williams, J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. (1990), DNA Polymorphisms Amplified By Arbitrary Primers Are Useful As Genetic Markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535
- Yıldırım A., Karadağ Y., Sakin M.A., Gökmen S., Kandemir N., Akkaya M.S., Yıldırım F., (2004), Transfer of Stripe Rust Resistance Gene Yr26 To Turkish Wheats Using Microsatellite Markers. Cereal Research Communications, 32(1), 25-30.

ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında İzmir Konak' da doğdu. İlköğrenimini İzmir Karşıyaka ve ortaöğrenimini Uşak Eşme' de tamamladı. 2012 yılında başladığı Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünden 2016 yılında mezun oldu. 2016-2017 yılında Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Tahıllar ve Yemelik Tane Baklagiller Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı.