T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BUĞDAYDA KAHVERENGİ PAS DAYANIKLILIK GENLERİNİN (Lr9, Lr19 VE Lr24) SELEKSİYONUNDA KULLANILACAK MOLEKÜLER MARKIRLARIN BELİRLENMESİ

GÜL ÇİÇEK KILIÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: DOÇ. DR. SEMRA HASANÇEBİ

EDİRNE-2017

Öğrencinin Gülçiçek KILIÇ'ın hazırladığı "**Buğdayda Kahverengi Pas Dayanıklılık Genlerinin (*Lr9, Lr19 ve Lr24*) Seleksiyonunda Kullanılacak Moleküler Markırların Belirlenmesi**" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):	İmza
Prof. Dr. İsmet BAŞER	.....
Doç.Dr. Semra HASANÇEBİ	.....
Yrd. Doç. Dr. Necmi BEŞER	.....
.....	.....
.....	.....

Tez Savunma Tarihi: 27/12/2017

Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

(Doç. Dr. Semra HASANÇEBİ)
Tez Danışmanı .....

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

.....
(Ünvan, Ad, Soyad)
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof.Dr. Murat YURTCAN
Enstitü Müdürü

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

27/12/2017

Gül Çiçek KILIÇ

Yüksek Lisans Tezi

Buğdayda Kahverengi Pas Dayanıklılık Genlerinin *(Lr9*, *Lr19* ve *Lr24*) Seleksiyonunda Kullanılacak Moleküler Markırların Belirlenmesi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Ülkemizde üretimi en yaygın olan tarım ürünlerinden biri buğdaydır ve buğday üretiminin gerçekleştiği önemli bölgelerden birisi de Trakya Bölgesi'dir. Kahverengi pas hastalığı (leaf rust) bölgede üretimi kısıtlayan ve ciddi verim kayıplarına neden olan bir buğday hastalığıdır. Bu kayıpların önüne geçilmesi için ıslah ile hastalığa dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi en ekonomik ve etkili yoldur. Moleküler çalışmalarla desteklenen klasik ıslah programları daha hızlı ve etkin olduğundan dolayı ilgili genler için moleküler markırların geliştirilmesi ıslah programları için çok önemlidir. Trakya Bölgesi'nde *Lr9*, *Lr19* ve *Lr24* kahverengi pas dayanıklılık genleri bölgedeki tüm pas ırklarına karşı dayanıklılık sağlamaktadır. Bu genlerle yakın bağlantılı moleküler markırların belirlenmesi, bölgede kahverengi pasa dayanıklı buğday geliştirmek için yapılan ıslah çalışmalarına önemli katkılar sağlayarak, hızlı ve kolay seleksiyon yapılmasını sağlayacaktır. Tek bir gen tarafından sağlanan dayanıklılık çabuk kırılabileceğinden, moleküler markırlar yardımıyla birden fazla dayanıklılık geniyle çalışmak ve bir genotipte toplanmasını (gen piramitleme) sağlamak mümkündür. Yapılan çalışmada literatürde bu genlerle bağlantılı olduğu rapor edilen aday moleküler markırlar test edilmiştir. Çalışma sonucunda *Lr9* geni için SCS5, *Lr19* geni için S253, S265, GbF/GbR ve Xwmc221, *Lr24* geni için J09-1/J09-2 ve H51/H52 markırlar selektif bulunmuş ve yapılacak ıslah çalışmalarında markır destekli seleksiyon (MAS)'da başarıyla kullanılabileceği ortaya konmuştur.

Yıl : 2017

Sayfa Sayısı : 62

Anahtar Kelimeler : *Lr9 , Lr19, Lr24,* moleküler markırlar, kahverengi pas, buğday

Master's Thesis

Determination of Selective Molecular Markers Linked to Brown Rust Resistance Genes (*Lr9, Lr19 ve Lr24*) in Wheat

Trakya University Institute of Natural Sciences

Biotechnology and Genetics

ABSTRACT

One of the most common agricultural crops in our country is wheat and one of the important regions where wheat production takes place is the Thrace region. Brown rust (leaf rust) is a wheat disease that restricts production in the region and causes severe loss of yield. Development of disease-resistant varieties is the most economical and effective way to avoid these losses. Because the conventional breeding programs supported by molecular studies are faster and more efficient, the development of molecular markers for the relevant genes is crucial for breeding programs. In Trakya Region, *Lr9*, *Lr19* and *Lr24* brown rust resistance genes provide resistance against all rusts in the region. Identification of molecular markers that are closely related to these genes will provide rapid and easy selection by providing significant contributions to breeding studies to improve brown rice paddy-resistant wheat in the area. Because the resistance provided by a single gene can be broken quickly, it is possible to work with multiple resistance genes with the aid of molecular markers and to assemble into a genotype (gene pyramid). In the study, candidate molecular markers reported to be linked to these genes in the literature have been tested and found to be SCS5 for the *Lr9* gene, S253, S265, GbF / GbR and Xwmc221 for the *Lr19* gene, J09-1 / J09-2 and H51 / H52 markers for the *Lr24* gene and marker-assisted selection (MAS).

Year : 2017

Number of Pages : 62

Keywords : *Lr9, Lr19, Lr24,* molecular markers, brown rust, wheat

ÖNSÖZ

Temel besin kaynağı olan buğday, sadece Türkiye açısından değil dünya açısından da yaşamsal öneme sahiptir. Artan nüfusun gıda güvenliğinin sağlanması amacıyla önemli besin maddesi olan buğday sürekli önemini korumaya devam edecektir.

Günümüzde ve gelecekte önemini kaybetmeyecek olmasından dolayı buğday verimini etkileyen hastalıklar önemli bir konudur, hastalıklardan kaynaklanan verim kayıplarının giderilmesi için hastalığa dayanıklı çeşitler geliştirmek en ekonomik yoldur. Ne kadar klasik ıslah yöntemleriyle hastalıklara dayanıklı çeşitlerin geliştirilme çalışmaları yapılsa da bu yöntem çok zaman alıcı ve zahmetlidir.

Buğday üretiminin gerçekleştiği önemli bölgelerden biri olan Trakya Bölgesi'nde buğday verimini etkileyen en önemli hastalıklardan birisi kahverengi pastır. Bu çalışmada Trakya Bölgesi'nde kahverengi pas hastalığına dayanıklılık sağlayan *Lr9*, *Lr19* ve *Lr24* genlerinin markır destekli seleksiyonda kullanılmak üzere markır çalışmaları yapılmıştır.

Tez çalışmam boyunca, öncelikle her türlü konuda yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, yeri geldiğinde bir arkadaş kadar samimi olabilen tez danışmanım Doç. Dr. Semra HASANÇEBİ'ye (Trakya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü), ıslahçılık anlamında bir bilgi bankası olan, buğdayı bana sadece laboratuvarda değil aynı zamanda sahada da tanıma ve inceleme fırsatı veren Yrd. Doç. Dr. Necmi BEŞER'e (Trakya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü), çalışmam boyunca her türlü imkanı sağlayan Prof. Dr. Yalçın KAYA'ya (Trakya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölüm Başkanı) tüm emekleri için teşekkür ederim. Ayrıca iki sene boyunca hiçbir zaman maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen abim Kenan KILIÇ'a ve her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarım Çağlar ÇOLAK ve Gizem ÇİVİ'ye, laboratuvar çalışmalarında hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen Emrah AKPINAR'a teşekkür ederim.

Gül Çiçek KILIÇ, 2017

Bu tez çalışması Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TÜBAP 2017/26 numaralı proje ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TÜBAP Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **viii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **x**

ŞEKİLLER LİSTESİ ..... **xii**

ÇİZELGELER LİSTESİ ..... **xiv**

BÖLÜM 1 ..... **1**

GİRİŞ **1**

BÖLÜM 2 ..... **4**

2.1. Buğday'ın Önemi *4*

2.2. Buğday'ın Kökeni *5*

2.3. Buğday'da Pas Hastalıkları *6*

2.3.1. Sarı pas 8

2.3.2. Kara pas 8

2.3.3. Kahverengi pas 9

2.4. Üredinial Enfeksiyonun Gelişimi *12*

2.5. Buğdayda Kahverengi Pas Dayanıklılığı *13*

2.6. Islahta Seleksiyon ve Moleküler Markırlar *18*

2.7. Kahverengi Pas Dayanıklılığı ile İlişkili Moleküler Markırlar *21*

2.8. Ülkemizdeki Kahverengi Pas ile İlişkili MAS çalışmaları *22*

BÖLÜM 3 ..... **23**

3.1. MATERYAL ve YÖNTEM *23*

3.1.1. Bitki Materyali 23

3.1.2. Hastalık Testleri 24

3.1.3. Moleküler Markır Analizleri 25
3.1.3.1. DNA izolasyonu 25
3.1.3.2. DNA miktar ve kalite tayini 27
3.1.3.3. Moleküler Markır çalışmaları 28
3.1.3.4. Kapiller elektroforez analizi 31
3.2. BULGULAR *32*
3.2.1 Hastalık Testleri 32
3.2.2. Genomik DNA İzolasyonu 33
3.2.3. Lr9 Geni İçin Kullanılan Markır Sonuçları 34
3.2.3.1. SCS5 markırı 34
3.2.3.2. J13 markırı 36
3.2.3.3. OPA19 ve OPD12 markırları 37
3.2.4. Lr19 Geni İçin Kullanılan Markır Sonuçları 38
3.2.4.1. S265 markırı 38
3.2.4.2. SCS253 markırı 40
3.2.4.3. Xwmc221 markırı 42
3.2.4.4. GbF/GbR markırı 44
3.2.5. Lr24 Geni İçin Kullanılan Markır Sonuçları 46
3.2.5.1. J09-1/J09-2 markırı 46
3.2.5.2. $SCS73_{719}$ markırı 48
3.2.5.3. H51/H52 markırı 50
BÖLÜM 4 52
4.1. SONUÇLAR ve TARTIŞMA *52*
KAYNAKLAR 56
ÖZGEÇMİŞ 61
TEZ ÖĞRENCİSİNE AİT TEZ İLE İLGİLİ BİLİMSEL FAALİYETLER 62

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

bç(bp): Baz çifti

dk : Dakika

M : Molarite

mA: Miliamper

mg : Miligram

ng: Nanogram

nm: Nanometre

ml : Mililitre

µl : Mikrolitre

mm : Milimetre

mM : Milimolar

ng : Nanogram

rpm : Rounds Per Minute (Dakikadaki devir sayısı)

s : Saniye

U : Ünite

Volt : Voltaj

% : Yüzde

°C : Santigrat derece

Kısaltmalar

AFLP:	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizm
BSA:	Sığır Serum Albümini
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
EDTA:	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EtBr:	Etidyum Bromür
HCl:	Hidroklorik Asit
HR:	Hızlı Hücre Ölümü
gDNA:	Genomik DNA
***Lr*:**	Kahverengi Pas Dayanıklılık Geni
MAS:	Markır Destekli Seleksiyon
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PVP:	Polivinil Prolidon
R:	Tanıma geni
RFLP:	Sınırlı Parça Uzunluk Polimorfizm
RNA:	Ribonükleik Asit
SCAR:	Amplifikasyon Bölgesi Karakterize Edilmiş Dizi
SDS:	Sodyum Dodesil Sülfat
SNP:	Tek Nükleotid Polimorfizm
SSR:	Basit Tekrar Dizileri
STS:	İşaretli Bölge Dizileri
TAGEM:	Tarımsal Araştırmalar ve Politakalar Genel Müdürlüğü
Tc*:	Thatcher
Tris:	Trizma Base
UV:	Ultraviyole

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Ticari buğdayların orijini…….....5

Şekil 2.2. Türkiye'deki buğday hastalıklarının dağılımı……..6

Şekil 2.3. Yaprak yüzeyindeki kahverengi pas püstülleri…….9

Şekil 2.4. *Puccinia triticina*'nın yaşam döngüsü……10

Şekil 2.5. Buğdayın kahverengi pas yüzünden zarar görme ölçeği……11

Şekil 2.6. Üredinial enfeksiyonun gelişim aşamaları…….13

Şekil 2.7. Bazı *Lr – Sr – Yr* genlerinin buğday kromozomu üzerindeki lokasyonları….15

Şekil 2.8. *Lr* genleri içeren hatların ortalama enfeksiyon katsayısı……16

Şekil 2.9. Mikrosatelitlerin uç kısımlarındaki özgü diziler……19

Şekil 2.10. SCAR primer üretimi…….…….....19

Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan buğdayların tarladan bir görüntüsü……..23

Şekil 3.2. Tez çalışmasının yürütüldüğü laboratuvar…….25

Şekil 3.3. Bitki dokularının parçalanması……..26

Şekil 3.4. Soğuk ethanol içerisinde yoğunlaşan DNA ve RNA molekülleri……...27

Şekil 3.5. Bitki dokularından izole edilen bazı gDNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü…….33

Şekil 3.6. SCS5 markırı ile yapılan PCR sonucu……34

Şekil 3.7. Ebeveynler ile Morocco x Tc*Lr9 melezinden elde edilen F_2 bireylerinde SCS5 markırı ile tarama……...35

Şekil 3.8. J13 markırı ile yapılan PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri……36

Şekil 3.9. OPA19 ve OPD12 markırları ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü……37

Şekil 3.10. SCS265 markırı ile yapılan PCR sonucu……..38

Şekil 3.11. Ebeveynler ve Morocco x Tc*Lr19 melezinden elde edilen F_2 bireylerinde SCS265 markırı tarama……39

Şekil 3.12. SCS253 markırı ile yapılan PCR sonucu……..40

Şekil 3.13. Ebeveynler ve Morocco x Tc*Lr19 melezinden elde edilen F_2 bireylerinde SCS253 markırı tarama……41

Şekil 3.14. Xwmc221 markırı ile yapılan PCR sonucu……..42

Şekil 3.15. Ebeveynler ve Morocco x Tc*Lr19 melezinden elde edilen F_2 bireylerinde Xwmc221 markırı tarama……43

Şekil 3.16. GbF/GbR markırı ile yapılan PCR sonucu……...44

Şekil 3.17. Ebeveynler ve Morocco x Tc*Lr19 melezinden elde edilen F_2 bireylerinde GbF/GbR markırı tarama……45

Şekil 3.18. J09-1/ J09-2 markırı ile yapılan PCR sonucu……...46

Şekil 3.19. Ebeveynler ve Morocco x Tc*Lr24 melezinden elde edilen F_2 bireylerinde J09-1/J09-2 markırı tarama……..47

Şekil 3.20. $SCS73_{719}$ markırı ile yapılan PCR sonucu……48

Şekil 3.21. Ebeveynler ve Morocco x Tc*Lr24 melezinden elde edilen F2 bireylerinde $SCS73_{719}$ markırı tarama……..49

Şekil 3.22. H51/H52 markırı ile yapılan PCR sonucu elde edilen jel görüntüsü…….50

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 2.1. *Lr* genlerinin seleksiyonu için kullanılabilecek bazı moleküler markırlar…21

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan bitki örneği sayıları…….24

Çizelge 3.2 Her bir dayanıklılık geni için literatürden bulunan markırlar…….28

Çizelge 3.3 Tüm markırlar için kullanılan PCR koşulları……....29

Çizelge 3.4 Tüm markırlar için kullanılan PCR basamakları……...29

Çizelge 3.5 PCR Master Mix kullanılarak yapılan PCR karışımı…….30

Çizelge 3.6 Kapiller elektroforezinde kullanılan kitlerin içeriği……..32

Çizelge 3.7 Tüm markırların Morocco ile Tc*9, Tc*19 ve Tc*24 ebeveynlerinin melezlerinden elde edilen F_2 bireylerinde tarama sonucu……....51

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Buğday (*Triticum aestivum* L.), basit bir beslenme kaynağı olmasından dolayı dünya üzerinde en çok ekimi yapılan tahıldır ve çok önemlidir. Fungal pas hastalıkları, buğdayın en önemli hastalıklarındandır. Her yıl dünya üzerinde, pas hastalığı yüzünden büyük oranda verim kayıpları gerçekleşmektedir (Wellings, 2011). Buğdayda, sarı (*Puccinia striiformis*), kahverengi (*Puccinia recondita*), ve kara (*Puccinia graminis*) pas olmak üzere üç çeşit pas hastalığı türü vardır. Buğday bitkilerini hastalık etmenlerinin oluşturduğu zararlardan korumak için ne kadar çok uğraşılsa da hala kayıplar çok fazla olmaktadır. Pas hastalığı bitkilerin fotosentez alanını daraltır ve bin dane ağırlığını düşürür (Akın, 2007). Pas hastalıkları dünyada bilinen en eski hastalıklardandır. *Puccinia spp.* tarafından meydana getirilen bu hastalıklar, bütün bitki hastalıkları içinde verdiği ekonomik zarar açısından birinci sırada yer almaktadır. Hastalıkların sebebiyet verdiği ürün kayıplarının dünyada üretilen toplam ürünlerin %12'si olduğu sanılmaktadır. Hastalıkların yapmış olduğu bu zararları önlemek için kimyasallar uygulansa da bu yöntem bitki hastalıklarının oluşturacağı zararları tam olarak önleyememektedir. Ayrıca kimyasalların kullanılması hem maliyeti arttıracağından hem de çevreye ve diğer canlılara verebileceği olası zararlar nedeniyle çok uygun görülmemektedir. Bu sebeple daha uygun olan başka bir yöntem hastalıklara karşı dayanıklı bitkilerin kullanımına yer verilmesi hastalıkların sebep olduğu ürün kayıplarının azaltılmasında önemlidir bundan dolayı kahverengi pasın neden olduğu verim kayıplarının önüne geçilmesi için genetik

olarak dayanıklı buğday çeşitlerinin geliştirilmesi dünya çapında birçok ıslahçı tarafından çalışılmaktadır. (Aykut, 2007).

Kahverengi pas; Trakya, Ege, Marmara, Karadeniz gibi bütün sahil bölgeleri ve Orta Anadolu Bölgesi'nde sulanır alanlarda etkili olmaktadır (Akın, 2007). Türkiye'de 2009 ve 2010 yıllarında ana buğday üreticisi bölgelerden toplanan enfekteli buğday yapraklarından *Puccinia* koleksiyonları elde edilmiş ve patojen ırklarına karşı buğdayda hangi dayanıklılık genlerinin (*Lr*) etkili olduğu rapor edilmiştir. (Kolmer vd., 2012). Bugüne kadar buğdayda 80'e yakın *Lr* (Kahverengi pas dayanıklılık geni) geni ve bulundukları kromozomlar yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Davoyan vd., 2014).

Moleküler markırlar son yıllarda hem hayvan hem bitkisel kaynaklı çalışmalarda kullanılmaktadır. Moleküler markırlar çevre şartlarından etkilenmediklerinden dolayı özellikle çevre koşullarından çok fazla etkilenen ve fenotipik olarak gözlenmeleri zor olan karakterlerin seleksiyonunda kullanımları oldukça başarılıdır. Hatta seleksiyon etkinliğinin %99'a varan hassasiyetle gerçekleştiği söylenebilir (Sorrells & Wilson, 1997). Moleküler markırların kullanım alanlarından birisi de detaylı genetik ve fiziksel kromozom haritalarının oluşturulmasıdır. Bitkilerde moleküler markırların belirlenmesiyle haritalanmada büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Bitkilerde bir başka uygulama alanı da istenilen bir genin veya özelliğin bulunduğunu ispatlayan moleküler markırların kullanımıyla seleksiyon (MAS) gerçekleştirilmesi ve ıslah programlarının etkinliğini arttırmaktır (Bertnard vd., 2008; Gupta vd., 2010).

Birden fazla aynı karaktere etki eden genlerin MAS yardımıyla bir genotipte toplanmasına gen piramidi denilmektedir. Genelde tek genle sağlanan dayanıklılık çabuk kırılacağından, aynı hastalığa dayanıklılık sağlayan genlerin bir genotipte toplanmasıyla kalıcı dayanıklılık sağlamak için gen piramitleme yapılır.

Son on yıl boyunca buğdayda saptanan ve haritalanan *Lr* (Leaf rust) dayanıklılık genlerinin sayısı önemli derecede artmıştır. Moleküler markırların kullanımı geliştirilen çeşitlere *Lr* genlerinin aktarılmasını kolaylaştırır. MAS kullanılarak Macaristan'da kışlık buğday çeşitlerine *Lr9, Lr24, Lr25, Lr29, Lr35* ve *Lr37* genlerinin aktarılma çalışmaları yapılmıştır. Vida vd. 2010'da yaptıkları çalışma da *Lr* genleriyle yakından bağlantılı olduğu STS, SCAR ve RAPD markırlarını kullanılarak belirlemişlerdir. Ayrıca *Lr1, Lr10, Lr26, Lr34* ve *Lr34* dayanıklılık genleri de moleküler markırlar kullanılarak gösterilmiştir

(Vida vd., 2010). Günümüzde kahverengi pasa dayanıklılık sağlayan 70'nin üstünde farklı gen bilinmektedir (Liu vd., 2014). Bazı *Lr* dayanıklılık genlerine (*Lr1, Lr9, Lr10, Lr13, Lr19, Lr23, Lr24, Lr25, Lr27, Lr28, Lr29, Lr31, Lr34, Lr35, Lr37* ve *Lr47*) yakın bağlantılı markırların geliştirilmesinde RFLP ve RAPD stratejileri başarılı bir şekilde uygulanmaktadır (Aykut, 2007). Kolmer vd. 2012'de yaptığı bir çalışmada moleküler markırlar kullanarak yirmi buğday çeşidinde *Lr34* ve üç buğday çeşidinde de *Lr37* dayanıklılık geninin bulunduğunu göstermişlerdir. Vida vd. 2010'da yaptıkları bir çalışmada ise *Lr9*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr28*, *Lr29* ve *Lr35* genlerinin çoğu pas ırkı için dayanıklılık sağladıklarını söylemişlerdir. Ayrıca yazılan bir raporda ise *Lr9*, *Lr19*, *Lr24* ve Lr29 genlerinin Trakya Bölgesi'ndeki tüm kahverengi pas ırklarına karşı dayanıklılık sağladığını söylemişlerdir (Akan & Yazar, 2013). Bundan dolayı bu genlerin moleküler markır çalışmalarını yapmak önemlidir.

Bu tez çalışmasında Trakya Bölgesi'nde etkili olan kahverengi pas ırklarına dayanıklılık sağlayan *Lr9*, *Lr19* ve *Lr24* dayanıklılık genlerinin MAS'da kullanılmak üzere moleküler markırların belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu genlere özgü aday markırlar literatürde yer alan çalışmalardan seçilmiştir. Tez çalışmasında literatürde verilen bu markırların *Lr9*, *Lr19* ve *Lr24* dayanıklılık genleri için ne kadar seçici olduğu ve ıslah programlarında rutin biçimde kullanılabilirliği test edilmiştir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Buğday'ın Önemi

Tahıllar içerisinden buğday, yaygın olarak ekimi yapılabilen bir bitkidir. Dünya'da ekili arazinin %20'sinde yetiştirilebilmektir (Bockus vd., 2010). Adaptasyonunun geniş olması, uygun beslenme değerleri ve taşınma, saklama, işlenmesindeki kolaylıklar nedeniyle buğday, çoğu ülkenin temel besini durumundadır (Aykut, 2007).

Buğday insanların %75 karbonhidrat ve %50 protein ihtiyacını karşılamasından dolayı insan beslenmesinde kullanılan tahıl ürünlerinin başında gelmektedir. (Bockus vd., 2010). Türkiye'de en çok ekmek şeklinde tüketilen buğday temel karbonhidrat kaynağıdır ve günlük enerji ihtiyacının büyük bir kısmını karşılar. Az bir miktar ekmek tüketilerek günlük demir, kalsiyum ve protein ihtiyacının makul bir kısmı karşılanabilir (Özberk, 2016). Mısır ve pirince göre daha besleyicidir. Protein (bazı esansiyel aminoasitleri az içermesine rağmen, özellikle lizin), karbonhidrat, lif, mineraller ve belirli vitaminler için mükemmel bir kaynaktır. Dünya nüfusunun %40'ı için temel bir besindir ve harcanan kalorinin %20'sini sağlar. Ayrıca az miktarda hayvan, süt veya baklagil proteini ile beraber tüketildiğinde buğday ürünleri dünyanın birçok yerinde sağlıklı beslenme sağlar (Bockus vd., 2010).

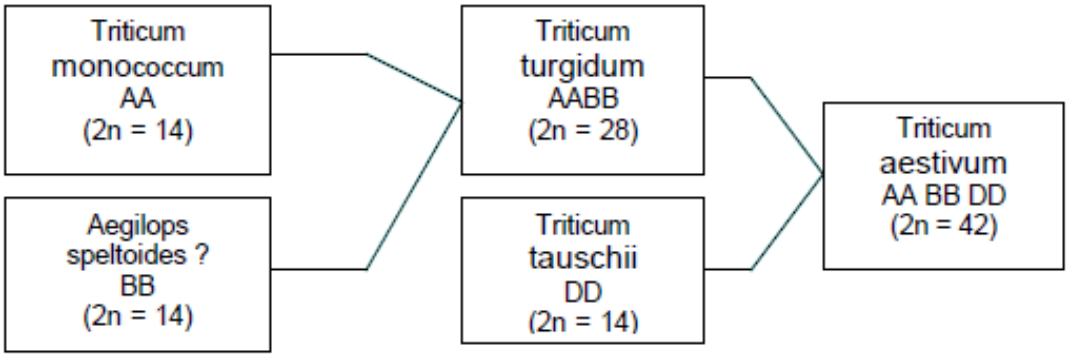
Buğdaylar arasında en çok yetiştirilen buğday türü hekzaploid yapıda olan ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.)'dır. Buğday tanesinde, gluten bulunmaktadır. Gluten fermantasyon sırasında oluşan CO_2'i hamur içinde tutarak hamurun kabarmasını sağladığından ekmek yapımında kullanılmaktadır (Aykut,2007).

Buğday türleriarasında en çok yetiştirilen hekzaploid yapıdaki ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.)'dır. Buğday tanesinde bulunan gluten fermantasyon sırasında oluşan CO_2'i hamur içinde tutarak hamurun kabarmasını sağladığı için ekmek yapımında kullanılır bundan dolayı ekmeklik buğday olarak adlandırılır (Aykut,2007). Buğday insanların beslenmesinde merkezi role sahip olmasına rağmen, son yıllarda üretimi pirinç ve mısır üretiminin gerisine düşmüştür. Dünya genelinde buğday üretimi 500 milyon tonu aştığı halde bu miktar 2030 yılında tahmini dokuz milyar insan nüfusunu beslemek için iki katına çıkarılmalıdır. Bu artış dünya çapında buğday ekilen alanın bugünkü büyüklüğünden 200 milyon hektar aşması beklenmediğinden yalnızca alanın birim başına verim potansiyelini arttırmakla başarılabilir (Bockus vd., 2010).

Buğday mahsul kayıplarının en büyük nedenlerinden biri de buğday zararlıları ve buğday hastalıklarıdır. Bu mahsul kaybının önüne geçilmesindeki en önemli yollardan biri de konukçuya genetik dayanıklılık kazandıracak manipülasyonlar yapmaktır, bu yöntem ekonomik açıdan en uygun, çevresel açıdan güvenli ve sürdürülebilir bir yöntemdir (Bockus vd., 2010).

2.2. Buğday'ın Kökeni

Buğday yaklaşık 10,000 tür içeren Poacceae ailesinden Triticeae grubunun üyesi olan Triticium cinsine aittir. Buğdayda diploid (AA) (2n=14), tetraploid (AABB) (2n=28) ve hekzaploid (AABBDD) (2n=42) türlerinin poliploid serisini oluşturan karmaşık bir evrim geçmişi vardır (Bockus vd., 2010).



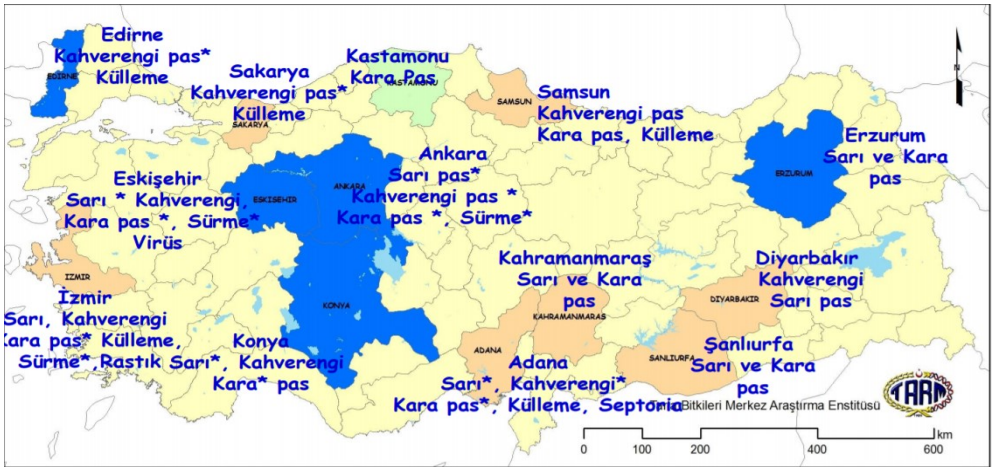
Şekil 2.1. Ticari buğdayların orijini (Mızrak, 2011).

Triticum turgidum, makarnalık buğdayların atasıdır ve *Triticum monococcum* ve *Aegilops speltodies*'in doğada melezlenmesinden oluştuğu tahmin edilmektedir. *T.turgidum*'un mutasyona uğraması ve seleksiyonlarla birlikte bugün üretimi yapılan ve tetraploid buğdayların atası olan *T.durum* oluşmuştur. Ekmeklik buğdayların ataları ise *T.turgidum*'un, *T.tauschii* ve diğer yabani türleriyle melezlenmesi ve seri mutasyonlar sonucu oluşmuşlardır (Mızrak, 2011).

Bir diploid buğday olan *T.monococcum* ilk olarak yaklaşık 13.000 yıl önce Türkiye'nin güneydoğusunda kültüre edilmiştir. Tetraploid buğdaylar (makarnalık buğdaylar) yaklaşık 9.000 yıl önce kuzey Suriye'de ya da Türkiye'nin güneydoğusunda kültüre edilmiştir. Hekzaploid buğdayların (yaygın olan türler, ekmeklik buğdaylar) yetiştiriciliği yaklaşık 6.000-8.000 yıl önce ortaya çıkmıştır. Son zamanlarda, diploid buğdayların çok nadir kültürü yapılmaktadır, ekimi yapılan buğdayların %90-95'i hekzaploid yapıda olan ekmeklik buğdaylardır geri kalanı ise tetraploid yapıda olan makarnalık buğdaylardır (Bockus vd., 2010).

2.3. Buğday'da Pas Hastalıkları

Tahıllarda hastalık yapan organizmalar arasında en önemlilerden biri patojenik mantarlardır ve ülkemizde bu hastalıklara neredeyse her bölgede rastlanabilmektedir (Şekil 2.2). Bunlar arasında ise pas hastalıkları ciddi verim kayıpları ile öne çıkmaktadır. Bunlar buğdayın en yaygın ve önemli hastalıkları olmasından dolayı üzerinde en çok çalışılan bitki hastalıklarındandır (Aykut, 2007).



Şekil 2.2. Türkiye'deki buğday hastalıklarının bölgesel dağılımı (Akan & Yazar, 2013)

Hastalığa sebep olan mantar *Puccinia* cinsine ait biyotrofik bir patojendir. Bu cinse ait 3 farklı tür, birbirine benzer derecede etkili 3 farklı pas hastalığı oluşturmaktadır; (i) sarı pasa *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (Pst), (ii) kahverengi pasa (yaprak pası) *Puccinia triticina* f. Sp. *tiritici* ve kara pasa da *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* neden olmaktadır. Her bir fungus türü konukçu bitkilerde benzer hastalık semptomlarına sebep olur ve enfeksiyon yapabilmesi için benzer koşullara ihtiyaç duyar. Hastalıklar bitkinin görünümünden isimlerini alırlar, bu fungus türleri bitki üzerinde "pas" görünümü verir. Pas hastalığına sebep olan mantar cinslerinin özellikleri besin maddelerini kendileri üretmek yerine canlı ya da ölü konukçu dokusundan elde ederler. Mantarlar tohum ya da topraktan bulaşabildikleri gibi rüzgâr, su, böcek, hayvan veya insanlar yoluyla da yayılabilir (Presscott vd., 1986). Hatta rüzgarla kıtalar arası taşınarak etkin bir yayılma gösterebilmektedirler.

Pas hastalıkları, buğday yetiştiriciliğinde çok öncelerden beri bahsedildiği için tarihsel olarak büyük önem taşırlar. Buğday pasları, temel besin kaynaklarını yok ederek erken uygarlıkların gidişatını değiştirmiş ve büyük kıtlıklar yüzünden göçlere sebep olmuştur. Kuzey Amerika'da son on yılda pas haslıklarının yılda bir milyon ton buğday verimini azalttığı tahmin edilmiştir. Orta Asya'daki buğday üretiminde sarı ve yaprak pası hastalıklarından dolayı birkaç kez önemli verim kayıpları meydana gelmiştir. Benzer istatistikler dünyanın birçok buğday yetiştiriciliği yapılan bölgesi için yakın olabilir (Bockus vd., 2010)

Ülkemizde 2016 yılında 64,3 milyon ha alanda ekmeklik buğday, 12,3 milyon ha alanda makarnalık buğday (durum) tarımı gerçekleştirilmiş olup, 16,98 milyon ton ekmeklik buğday, 3,62 milyon ton makarnalık buğday üretimi gerçekleştirilmiştir. (TUİK) Ülkemizde pas hastalıkları buğdayda verim kaybına yol açan en önemli faktörler arasındadır, farklı yıllarda kaydedilen verilere göre farklı pas türlerinin oluşturduğu ürün kayıpları %12-80 arasındadır. Ürün kaybı; çeşitlerin hassasiyetlerine, enfeksiyon zamanına, çevre koşullarına göre değiştiği gibi bölgeden bölgeye yıldan yıla da değişebilir. Pas hastalıklarının epidemi oluşturduğu yıllarda hassas çeşitlerde meydana gelen erken enfeksiyonlar sonucu ise ürün kayıpları %90'lara çıkabilmektedir (Mert, Karakaya, Akan, Çetin & Düşünceli, 2012).

2.3.1. Sarı pas

Puccinia striiformis fungusunun neden olduğu "sarı pas" hastalığının belirtileri yapraklar üzerinde sarı ile portakal renginin değişik tonlarına sahip üredіosporların meydana getirdiği dar şeritler halinde oluşan püstüllerdir. Püstüller dardır ve değişik uzunluklarda olabilirler. Püstüllerin şerit halinde dizilmeleri sarı pasın önemli ayırıcı özelliğidir. Genelde bitkilerin alt yapraklarında oluşmaya başlar, önceleri açık renkli olan pas püstülleri uygun koşullarda hızla yayılarak bayrak yaprağa kadar ulaşarak yaprakların tüm yüzeylerini kaplayabilirler. Başak çıkarma devresinden sonra başakçıktaki kavuzları da enfekte edebilirler. Zamanla pas püstüllerinin renkleri koyulaşarak portakal rengi ve kahverengiye dönüşerek hastalığın ileri safhalarında enfekte olmuş dokular kuruyarak canlılığını kaybeder (Herdem vd., 2002).

Sarı pas, buğday, arpa, çavdar ve bunlarla akraba birçok bitkiyi enfekte edebilirler. Bu hastalık buğday üretilen yüksek rakımlı ve ılıman iklime sahip her yerde tespit edilmiştir. Şiddetli enfeksiyonlar başakta tane sayısını ve tane kalitesini düşürerek verimde büyük kayıplara neden olur (Herdem vd., 2002).

2.3.2. Kara pas

"Kara pas" *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* fungusu neden olmaktadır. Koyu kırmızı kahve renkli püstüller yaprağın iki yüzünde, sapta ve başakta oluşabilir. Hafif enfeksiyonlarda, dağınık yerlerde oluşan püstüller ağır enfeksiyonlarla da birleşebilir. Püstülleri meydana getiren üredіospor kümeleri epidermisi yırtıp çıktığında bitki yüzeyi pürüzlü ve yırtık bir görünüş almaktadır (Herdem vd., 2002). Hastalığın ileriki evrelerinde kırmızımsı kahverengi lezyonlar oluşur. Patlayan pas püstülleri çok sayıda siyah sporlar oluşturur. Paslar içinden bitkiye en çok zarar veren hastalıktır (Aykut, 2007). Son zamanlarda Ug99 patojen ırkı buğdayda kara pasa sebep olan ve dayanıklılık genleri içeren çoğu çeşitleri bile hasta edebildiğinden dolayı, buğday üretimine global bir tehdit oluşturmaktadır (Zhanga vd., 2017).

Kara pas başakta tane sayısı ile bin tane ağırlığını ve kalitesini düşürür. Hastalığa uygun şartlar tam oluştuğunda bütün ürün kaybedilebilir (Herdem vd., 2002).

2.3.3. Kahverengi pas

Puccinia triticina fungusunun sebep olduğu "kahverengi pas" aynı zamanda "yaprak pası" ve "turuncu pas" olarak da adlandırılır, belki de buğdayda en yaygın görülen hastalıktır. Belirtileri yuvarlağa yakın şekilli Şekil 2.3'de görüldüğü gibi kahverengi ürediospor kümelerinden oluşan pas püstülleri yaprak ayası ve kınının üst yüzeyinde, üst boğum arası ve kılçıklarda lokal olarak bulunabilir (Herdem vd., 2002).

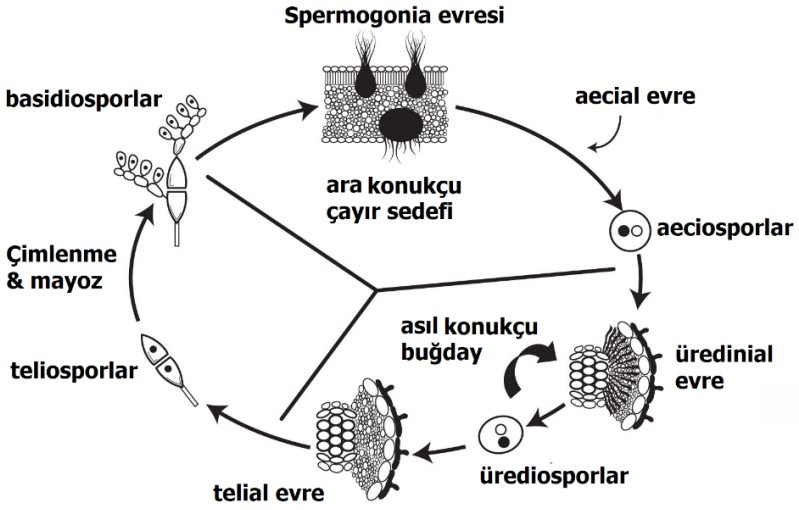


Şekil 2.3. Yaprak yüzeyindeki kahverengi pas püstülleri

Yaprak yüzeyinde ilk enfekte dokusu üzerinde oval küçük dairesel sarı sporlar olarak başladığı için sıklıkla sarı pas ile karıştırılır, hastalık ilerledikçe sarı oval sporlar turuncu rekli püstüllere dönüşür, turuncu veya kahverengi olan püstüllerin çapları 0.5-1.0 mm arasında değişmektedir, hastalığın ileriki aşamalarında kahverengi paslar rastgele dağılmış olma eğiliminde olduklarından dolayı da sarı pasla ayrımları kolaylaşır. Püstüller yaprak üzerinden kolayca uzaklaştırılabilen çok miktarda spor üretir (Marsalis & Goldberg, 2016).

Pas mantarları, iki farklı spesifik konukçu bitki ve beş farklı spor evresi gerektiren karmaşık yaşam döngülerine sahiptir. Yaşam döngüsünü tamamlamak için iki konukçu bitki gerektiren fungus genellikle bir asıl konukçu bir de ara konukçuya gereksinim duyar. Asıl konukçu, buğdaydır. Ara konukçu tipik bir yabani ot veya yerli bir bitkidir ve eşeyli üreme evresini burada tamamlar. Örneğin *Berberis* bitkilerinde üretilen sporlar (aeciospores) buğdayı enfekte ederken, buğdayda üretilen başka bir spor türü (basidiospores) *Berberis* bitkilerini enfekte etmektedirler (Şekil 2.4). Her iki konak da tam yaşam döngüsünü tamamlamak için gerekli olmasına rağmen, buğdayda enfeksiyonlar hızla gelişebilir; çünkü buğdayda üretilen sporlar (üredіosporlar)

üretildikleri bitkide tekrar enfeksiyon yaptıkları için oto-enfeksiyona neden olabilir (Marsalis & Goldberg, 2016).



Şekil 2.4. *Puccinia triticina*'nın yaşam döngüsü (Marsalis & Goldberg, 2016)

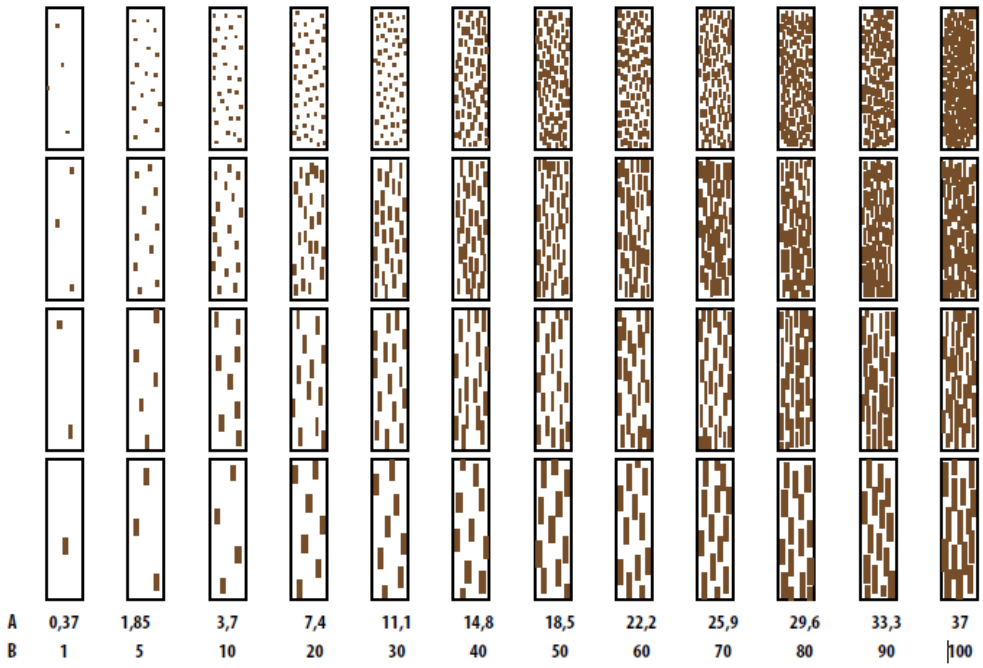
Çevre şartları hastalığın gelişmesi için uygunsuzlaştıkça, teliosporlar oluşmaya başlar, bunlar üredіosporların aksine çevre şartlarına daha dayanıklıdırlar. Uygun ortam koşullarında ise çimlenerek basidiosporları oluştururlar. Basidiosporlar buğdayı enfekte etmezler ancak ara konukçulara bulaşırlar. Onlar üzerinde eşeyli yaşam döngülerini tamamlayarak aeciosporları oluştururlar, bunlar buğdayı enfekte eder ve üredіospor üreterek yeni yaşam çemberini başlatırlar. Eşeyli yaşam dönemi yeni pas ırklarının ortaya çıkmasına sebebiyet verebilir, bu yeni ırklar mevcut dayanıklı çeşitlerin dayanıklılıklarını kırabilir (Mızrak, 2011).

İlk enfeksiyonlar rüzgâr yardımıyla uzaklardan da gelebilen üredіosporlarca meydana getirilir. Mantar, enfekte yaprak dokusu canlı kaldığı sürece sürekli üredіosporlar üreten bir parazittir. Serbest rutubet 20ºC'ye yakın sıcaklıkta hastalık hızla gelişir ve her 10-14 günde yeni bir üredіospor nesli oluşur. Üreyen üredіosporlar rüzgarla beraber kaynak bitkilerinden yüzlerce kilometre uzağa taşınabilirler (Bolton, Kolmer & Garvin, 2008). Bitkiler olgunlaştığı ya da çevre şartları olumsuz hale geldiğinde siyahi renkli teliospor kümeleri oluşur. Kahverengi pas buğday da başak çıkarma devresinden sonra, sarı pasa göre daha geç devrede ve daha yavaş enfeksiyon yapmaktadır. Hastalık erken dönemde başlarsa çevresel şartlar da uygunsa verimde önemli düşüşler görülür (Herdem vd., 2002).

Kahverengi pas buğday, arpa, triticale ve bunlara akraba birçok cinsi hastalandırabilmektedir. Hastalık serin iklim tahıllarının yetiştirildiği her yerde görülmektedir. Hastalık etmeni epidemi yaptığı bölgelerde yerleşerek, uzun yıllar potansiyel tehlike olarak enfeksiyon yapmaktadır (Herdem vd., 2002).

Kuzey Amerika'da *P.triticina*, buğday yetiştiriciliği ile birlikte 17.yüzyıl başlarında gözlemlenmiştir, fakat tane kalitesini kara pas gibi etkilemediği için buğdayın önemli bir hastalığı olarak görülmediği için göz ardı edilmiştir. Ancak Trakya Bölgesi'nde verim kayıplarında etkili bir hastalık olması nedeniyle tez çalışmasına konu edilmiştir. Buğdayda *P.triticina* kaynaklı gerçekleşen enfeksiyonlarında verim kaybı genellikle tane sayılarının azalması ve tane ağırlıklarının azalması sonucunda gerçekleşir (Bolton vd., 2008).

Kahverengi pas hastalığı sırasında, bitkinin yapraklarında asimilasyon yüzeyinin daralması hastalığın şiddetine bağlıdır, fotosentezi ve yapraklardan özümlemeyi azalttığından taneye yeterince besin taşınamamaktadır. Yaprak üzerinde pas sporlarının yayılmasıyla hastalığın şiddeti artar (Şekil 2.5). Başaktaki tane sayısı ve tane kalitesini de düşürerek verimi azaltmaktadır (Herdem vd., 2002).

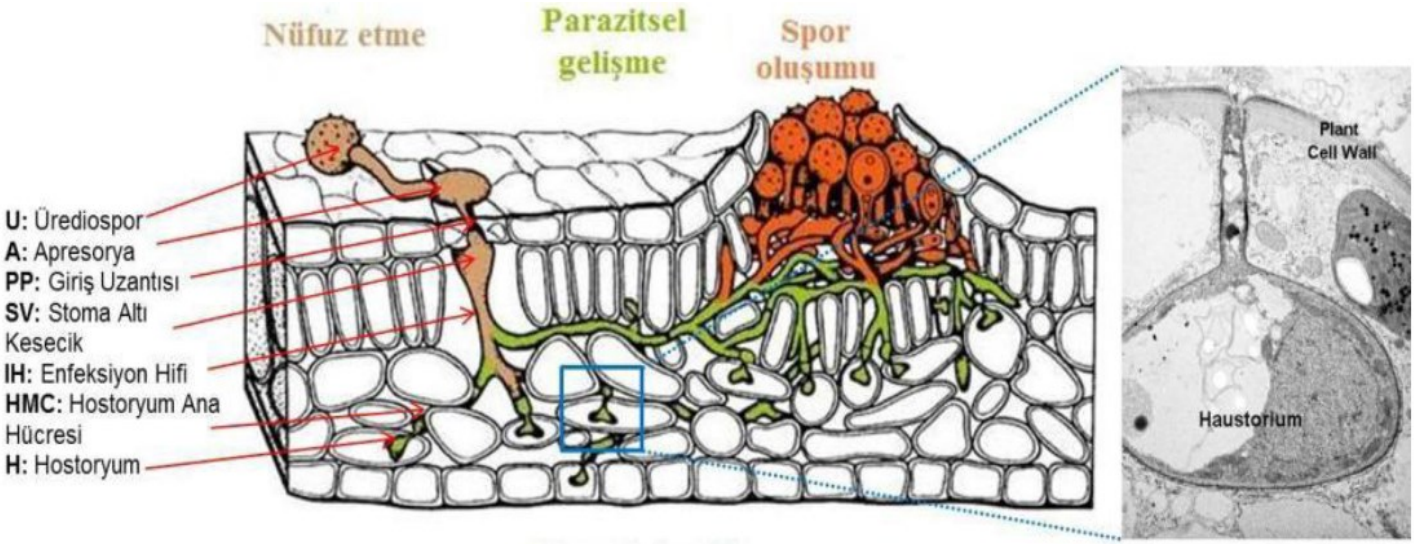


Şekil 2.5. Buğdayın kahverengi pas yüzünden zarar görme ölçeği (A: Pas sporları tarafından işgal edilen yaprak yüzeyi yüzdesi, B: Cobb skalasına göre pas şiddetleri)

Buğdayın yetiştirildiği neredeyse her yerde yaprak pası bulunmasına rağmen, mantarın üreme döngüsünü tamamlaması için uygun alternatif konukçular nadiren bulunur. *P.triticina*'nın moleküler genotiplendirme verileriyle birlikte uygun konukçu eksikliği üreme döngüsünün hastalık yayılımında epidemiyolojik olarak katkıda bulunmadığını ve Kuzey Amerika gibi dünyanın birçok önemli buğday yetiştirilen bölgelerinde *P.triticina* için önemsiz bir genetik varyasyon olduğu ileri sürülmüştür. Buna rağmen, patojen aseksüel üretiosporlardan üreme yoluyla devam ettiği Kuzey Amerika'da her yıl 70'den fazla patojen ırkı tespit edilmektedir (Bolton vd., 2008).

2.4. Üredinial Enfeksiyonun Gelişimi

Buğdayda *P.triticina* enfeksiyonun gelişim süreci ilk Allen tarafından 1926 yılında yapılan sitolojik çalışmada tanımlanmıştır (Bolton vd., 2008). Üretiosporlar tek hücrelidir ve dış çeperleri dikenli, hidrofobik bir yüzeyle kaplıdır. Fungus konak bitki üzerine rüzgâr gibi dış etmenlerle bulaşıp hidrofobik etkileşimler sayesinde tutunarak stomalar aracılığıyla doğal açıklıklardan giriş yapar. Yaprak yüzeyine yerleşen üretiosporlar yağmur veya çiy ile temas ederse su emip şişerek çimlenme tüpleri geliştirirler. Bu çimlenme 4-8 saat sonra 20^{o}C'de %100 nem altında gerçekleşir, sporlar çimlenmeden 1-3 gün canlılıklarını koruyabilirler (Bolton vd., 2008). *P.triticina* çimlenme tüpleri gelişmeye başlar ve bir stomaya denk gelene kadar büyümeye devam ederler. Çimlenme tüpleri stoma bulduğu zaman farklılaşarak apresoryum (Appressorium-A) yapısını oluşturur. Apresoryum bitki ile fungusun hem sıkı biçimde bağlanmasını sağlar hem de fungusun konak içine doğru büyümesini sağlar. Apresoryum farklılaşarak giriş uzantıları ve uçlarında stoma altı kesecikleri oluşturur. Bu kesecikler daralarak enfeksiyon hiflerini oluşturur ve bir mezofil hücresine temas edene kadar büyür. Temas ettiğinde bir hostoryal ana hücresine farklılaşır. Hostorya, konukçu ile biyotrofik ilişki kuran ve devam ettiren esas yapıdır ve besin alımında önemli rol oynar. Konukçu hücre içerisinde beslenmek için hostoryumu geliştiren fungus, ihtiyacı olduğu besin ve enerjiyi karşıladığından yaşam döngüsünü tamamlayabilmek için çoğalmaya başlar ve yayılır. Enfeksiyonun gelişimiyle Şekil 2.6'da görüldüğü gibi konak bitki yaprağı üzerinde yayılarak yeni hostorya yapıları oluşturur, kahverengi püstüller halinde kendini gösterir (Allen, 1926).



Şekil 2.6. Üredinial enfeksiyonun gelişim aşamaları (Hasançebi, 2013)

2.5. Buğdayda Kahverengi Pas Dayanıklılığı

Buğdayda kahverengi pas, pas hastalıkları arasında en sık rastlananıdır. Kahverengi pas fungusu farklı iklim koşullarına adapte olduğundan dolayı dünya çapında buğday yetiştiriciliği yapılan her bölgede bu hastalık bulunabilir. Kahverengi pasa duyarlı buğday çeşitlerinde, pas enfeksiyonu meydana geldiğinde, verimlerinde %5-15 veya daha fazla azalma görülür. Genetik dayanıklılık kahverengi pasdan dolayı verim kayıplarını azaltmak için en ekonomik ve tercih edilen bir yöntemdir (Kolmer, 1996).

Bitki üzerinde bir patojen yaşamını sürdürebilir ve çoğalabilirse konukçu bitki hassas (duyarlı), patojen ise virulent olarak adlandırılır ve aralarındaki ilişki uyumlu olarak tanımlanır. Patojen bitkiye herhangi bir zarar vermeden yalnızca normal yaşamını sürdürürse bu bitki patojene tolerant olarak tanımlanır. Ancak, bitki patojenin yaşamını sürdürmesini engelliyor, gelişme ve çoğalmasını durduruyorsa bu bitki dayanıklı, patojende avirulent olarak adlandırılır ve aralarındaki ilişki uyumsuz olarak tanımlanır (Tör, 1996).

Konukçu bitkinin en etkili savunma sistemi, aşırı duyarlılıktır (Hipersensitif Reaksiyon, HR). Bu dayanıklılık şekli, belirli patojenin bazı ırklarına karşı ortaya çıkabilirken, tüm ırklarına karşı da olabilir. Bu dayanıklılıkta, patojen ile temasa geçen konukçu hücre ve çevresindeki komşu hücreleri hızlı bir şekilde ölerek nekrotik lekeler halinde

kurumaktadırlar. Böylece bitki bu tepkiyle patojenin besin alımını engelleyerek gelişmesini durdurur (Tör, 1996).

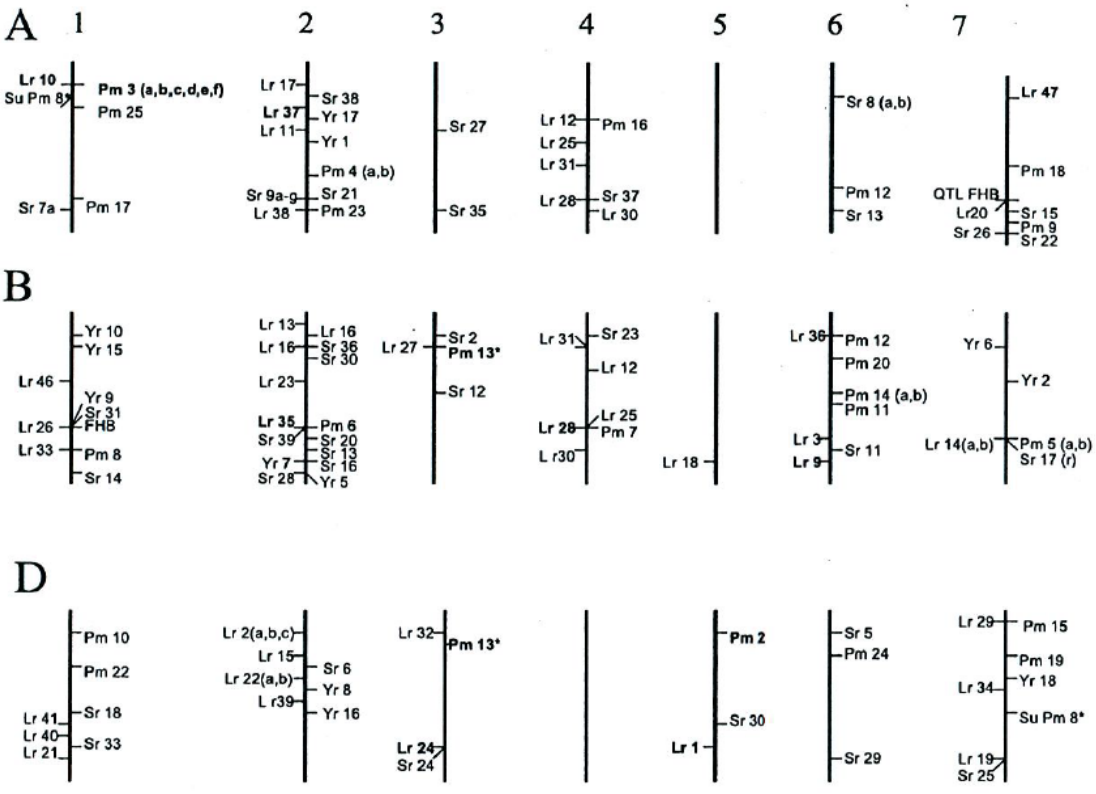
Bitkide dayanıklılık iki farklı yolla gerçekleşir, birincisi genel mekanizma olarak adlandırılır ve bitki tarafından patojenin hücre duvarı bileşiklerinin algılanmasıyla gerçekleşir, ikincisi ırka özgü dayanıklılık sağlayan tanıma (*Recognition-R*) genleri tarafından sağlanır. Her iki savunma sistemide bitkide HR mekanizmasını aktive eder (Tör, 1996). Bitki ve patojen arasındaki "gene-karşı-gen" etkileşimi, bitkide *R* genine karşılık gelen patojende bir avirulent (*avr*) geninin olmasıyla gerçekleşir. Birçok bitki patojen ilişkisi bu tiptedir. Reseptör görevi gören *R* genleri, patojenin *avr* geninin bir ürünü olan antijeni uyarıcı olarak algılayarak bitki savunma mekanizmalarını aktive eder. Patojenin *avr* genindeki mutasyon vb. sebeplerle değişmesiyle beraber bitkideki *R* genleri *avr* genlerinin antijenlerini tanıyamamakta ve bitkinin dayanıklılığı kırılmaktadır (Hammond-Kosack & Jones, 1997).

Üç pas türünü meydana getiren patojen ırkları için buğdayda dayanıklılığı sağlayan *R* genleri, kahverengi pas için *Lr* (leaf rust), kara pas için *Sr* (stem rust), sarı pas için *Yr* (yellow rust) olarak adlandırılır. Bu dayanıklılık genleri için dünya çapında uzun vadede birçok çalışmalar yapılmış ve birçok çeşitte farklı patotiplere spesifik dayanıklılık geni tespit edilmiştir. Bugüne kadar 71 *Lr*, 57 *Sr* ve 53 *Yr* genleri tanımlanmıştır (Liu vd., 2014).

Konukçu-patojen ilişkisinde, konukçu patojen dayanıklılığı sağlamaya çalışırken, patojen konukçunun bu direncini kırmaya çalışacaktır. Patojen dayanıklılığının kırılması bitki genotiplerindeki dayanıklılık genlerine karşı etkin ya yeni bir ırk oluşturarak (mutasyon, rekombinasyon, heterosis veya paraseksuel döngü yollarıyla) ya da başka bir yolu deneyerek gerçekleştirebilir. Islahçıların piyasaya sürdüğü dayanıklı çeşitler birkaç yıl içerisinde patojenler tarafından aşılmaktadır. Bu duruma örnek verilecek olursa, Çukurova bölgesinde daha önceden sarı pasa dayanıklı olarak bilinen Seri 82 çeşidi, daha güney bölgelerden gelen yeni bir pas ırkı Seri 82 çeşidini hastalandırarak önemli verim kayıplarına sebebiyet vermiştir (Akın, 2007). Başka bir örnekte sarı pas hastalığına neden olan yeni bir patojen suşunun neden olduğu salgının en az 12 ülkeyi etkilediği ve milyonlarca dolarlık ürün kaybında sebebiyet verdiği düşünülmektedir.

Buğdayda kahverengi pas dayanıklılık genleri (*Lr* genleri) üzerine yapılan çalışmalar buğday araştırmacıları tarafından dünya çapında yürütülmektedir. Bu çalışmaların ilk örneklerinden olan 1926'da yapılan bir çalışmada, buğday çeşitleri olan Malakof ve Webster'in her birinin sırayla *Lr1* ve *Lr2* olarak adlandırılan kahverengi pas dayanıklılık genlerine sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Soliman ve ark. (1964), *Lr1*, *Lr3* ve *Lr11* kahverengi pas dayanıklılık genlerini taşıyan kromozomları belirleyerek, haritalarını çıkarmışlardır (Bolton vd., 2008).

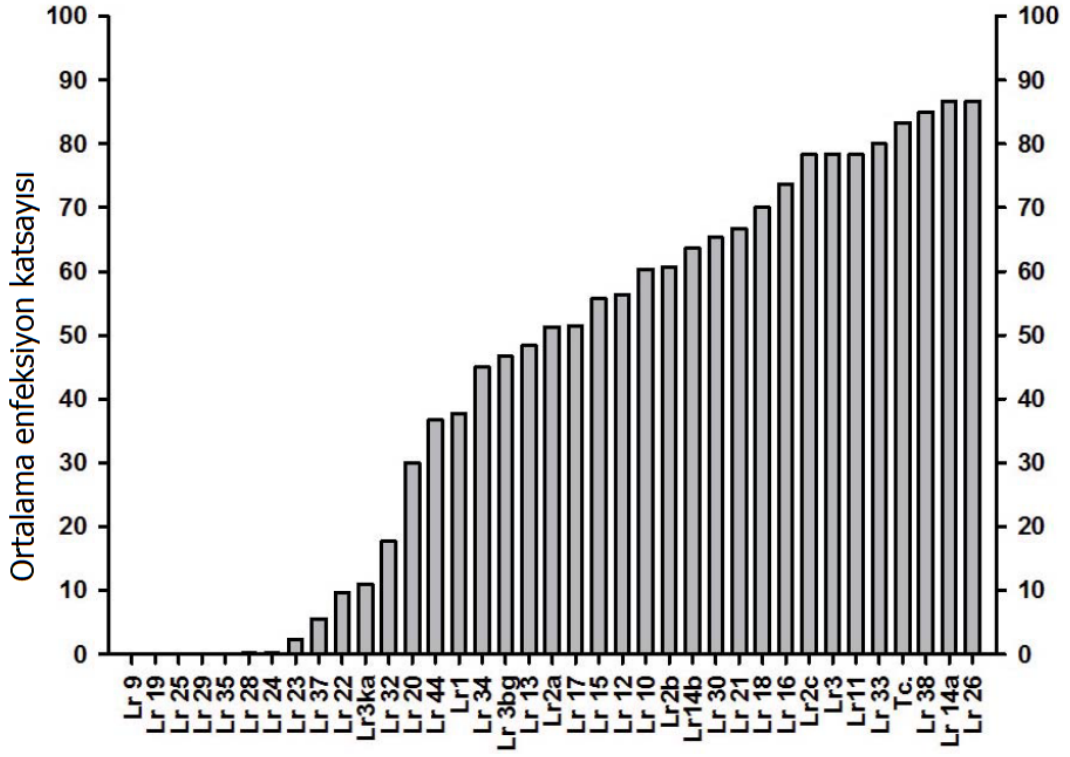
Son yıllarda buğdayda saptanan *Lr* (leaf rust) genlerinin sayısında önemli bir artış olmuştur, 80'e yakın spesifik *Lr* geni bilinmektedir (Davoyan vd., 2014). Bu genlerden çoğu *Agropyon elongantum* (*Lr24* ve *Lr19)*, *Aegilops umbellulata* (*Lr9)* gibi yabani türlerden buğdaya aktarılmıştır. *Agropyron elongantum*'dan köken alan *Lr19* dayanıklılık geni 7D kromozomunun uzun kolu (7DL) üzerinde bulunur (Gupta, Charpe, Prabhu & Haque, 2006a). *Lr24* dayanıklılık geni 3DL (Gupta, Charpe, Soul, Haque & Prabhu, 2006b) ve *Lr9* dayanıklılık geni ise 6BL üzerinde bulunur (Chelkowski & Stepien, 2001).



Şekil 2.7. Bazı *Lr – Sr – Yr* genlerinin buğday kromozomu üzerindeki lokasyonları (Chelkowski & Stepien, 2001)

Bu genler, genellikle hekzaploid buğday, tetraploid makarnalık buğday ve birkaç yabani diploid buğday türlerinde karakterize edilmiştir. Hekzaploid buğdayda, kahverengi pas dayanıklılık genleri, genom boyunca yaygın olarak dağılmış olup, 42 kromozom kolunun neredeyse her birinde bulunur. Dört allel seride tanımlanmıştır. *Lr2a*, *Lr2b* ve *Lr2c* genleri 2DS kolundaki bir lokusta *Lr3a*, *Lr3ka* ve *Lr3g* 6BL kolundaki bir lokusta haritalanmıştır, *Lr17a* ve *Lr17b* genleri 2AS kolundaki bir lokusta ve *Lr22a*, *Lr22b* genleri 2DS kolundaki bir lokustadırlar (Şekil 2.7) (Bolton vd., 2008).

Vida vd. 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada *Lr* genleri taşıyan hatların dayanıklılık derecelerini ölçmüşlerdir. Her biri farklı dayanıklılık geni veya alleli taşıyan hatlar deneyde kullanılmak üzere ekilmiştir. Sonrasında kahverengi pas dayanıklılığı seviyeleri ölçüldüğünde tek bir *Lr* geni içeren yedi çeşidin enfekte edilemediğini veya önemsiz bir seviyede enfekte olduğu görülmüştür. *Lr9*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr28*, *Lr29* ve *Lr35* genlerininden birini taşıyan buğday hatları hastalıktan hiç etkilenmemişlerdir. *Lr37* genini taşıyan buğday çeşitlerinde ise orta derecede hassaslık tespit edilmiştir. En büyük enfeksiyon derecesini gösteren buğday çeşidi ise *Lr26* genini taşımaktadır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. *Lr* genleri içeren hatların ortalama enfeksiyon katsayısı (Vida vd., 2010)

Rusya'nın Krasnodar bölgesinde yapılan bir çalışmada Lukyanenko Enstitüsünden alınan 46 ticari buğday çeşitinde *Lr* genleri varlığı araştırılmıştır. Batko, Grom, Nota, Kralya, Krasnodarskaya 99, Trio, Etnos, Yumpa çeşitlerinde *Lr10* geni tespit edilmiştir. Krasnodar bölgesinde etkili olan *Lr19* geninin Pallada ve Yara çeşitlerinde bulunduğu tespit edilmiştir. *Lr26* geni Bagrat, Vassa, Vershina, Irishka, Kuren, Laurent, Olkhon, Urup ve Fortuna çeşitlerinde tespit edilmiştir. Yetişkin bitki dayanıklılık geni *Lr34* Dmitry, Esaul, Kalym, Liga 1, Proton ve Yunona çeşitlerinde tespit edilmiştir. *Lr37* geni oldukça dayanıklı olan Morozko çeşidinde bulunmuştur. Adel, Ayvina, Vita, ve Yuka çeşitlerinin ise tek bir dayanıklılık geni içermediğini ve *Lr10*, *Lr26*, *Lr34* genlerini içerdikleri saptanmıştır. Afina, Doka, Tanya ve Utrish çeşitlerinde ise *Lr26* ve *Lr34* genlerinin, Kollega, Antonina, Stan, Kurs çeşitlerinde *Lr10* ve *Lr26* genlerinin, Zimtra çeşidinde ise *Lr10* ve *Lr34* genlerinin birlikte bulunduğu moleküler markırlar yardımıyla saptanmıştır. Yüksek dayanıklılık sağlayan *Lr9* ve *Lr24* genleri ise tespit edilememiştir (Davoyan vd., 2014).

Kahverengi pas dayanıklılık genlerinin çoğu, *P.triticina*'nın spesifik ırklarına etkili dayanıklılık gösterirler. Dayanıklılık genleri; fungusu tanır ve bitkide bir dizi savunma cevabının hızlı ve güçlü biçimde ortaya çıkmasını sağlarlar. Özellikle patojen tarafından enfekte edilen hücreleri ve komşuluğunda yer alan bir grupla birlikte programlı ölüme yönlendirir. Konukçu hücrelerin programlı hücre ölümü (Hypersensitive Reaction-HR) meydana getirmesi ile HR olarak tanımlanır ve en etkili savunma cevabıdır. Bu sayede başarılı biçimde konukçu hücreleri enfekte eden patojenin beslenme kaynağı kurutulmuş olur ve gelişip yayılması engellenir. Konak bitkide patojenin farklı patotiplerine karşı spesifik etkili *Lr* genleri yer almaktadır. Farklı dayanıklılık genleri, karakteristik direnç fenotipleri veya enfeksiyon tipleri ile belirlenir. *Lr12*, *Lr13* ve *Lr22a* gibi bazı genler en iyi bitki yetişkin dönemindeyken ifade edilir (Bolton vd., 2008).

Hastalığa dayanıklılığı arttırmak için en iyi yöntemlerden biride, farklı dayanıklılık genlerini tek bir konak genotipte toplayarak piramitlemektir. (Aykut, 2007).

Dünyada buğday yetiştiriciliği yapılan pek çok bölgede tam olarak kahverengi pas dayanıklılığı sağlayan az sayıda gen vardır. Buğdayda etkin dayanıklılık sağlamak için yeni dayanıklılık genleriyle çalışmalara devam edilmesi gereklidir. Buğdayda kahverengi pasın kontrolü için en etkili yöntem dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesidir. Bu alanda

ilerlemeyi sürdürmek için *Lr* genleriyle ilgili ıslahta ve gen piramitleme çalışmalarında kullanılmak üzere moleküler markır çalışmaları sürdürülmelidir.

2.6. Islahta Seleksiyon ve Moleküler Markırlar

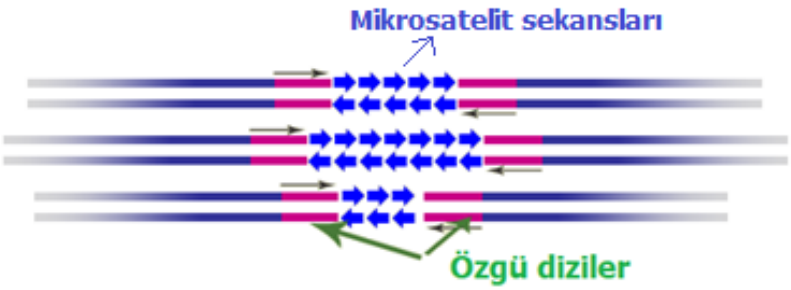
Bir bitkiyi diğerinden ayıran farklılıklar, bitkinin genetik materyali olan deoksiribonükleik asit (DNA) içinde kodlanır. DNA her biri bir ebeveynden gelen kromozom çifti halindedir. Bitkinin özelliklerini kontrol eden genler her kromozomun belirli bölümlerinde bulunur (Semagn, Bjørnstad & Ndjiondjop, 2006). Moleküler markırlar, genomda herhangi bir gen bölgesiyle ilgili DNA parçasıdır, aranan farklılıkları DNA düzeyinde gösterir ve incelenen genotiplerde istenilen genin olup olmadığını anlamak için kullanılabilirler. Çevreden etkilenmemeleri, sayılarının çok olmaları ve bitki gelişiminin herhangi bir evresinde kolaylıkla gözlenebilmeleri sayesinde ıslah çalışmalarında bitki materyalinin seleksiyonu için kullanımları oldukça etkindir (Güleç, Yıldırım & Sönmezoğlu, 2010).

Moleküler markırlar, polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) bağlı olmayanlar (RFLP) ve bağlı olanlar (RAPD, SSR, STS, SCAR vb.) olarak ikiye ayrılmaktadır. Açıklaması yapılan markır çeşitleri tez çalışmasında kullanılan markırlardır.

RAPD (Random Amplifed Polymorphic DNA), kısa oligonükleotid (6-10 baz) primerler kullanılarak PCR esnasında primerler rastgele genoma bağlanmakta ve çoğaltma işlemi yapmaktadır. PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra oluşan polimorfik bantlar dikkate alınarak bireylerin birbirinden ayrılmaları sağlanır. RAPD analizi uygulanması hızlı ve kolay olması avantajlarındandır. Normal PCR koşullarından farklı olmakta primer bağlanma sıcaklığı çok düşüktür (35-37^{o}C) ve tek primer kullanılmaktadır. PCR şartlarındaki ufak değişikliklerin bile sonuçları etkileyebilmesi laboratuvarlar arasında tekrarlanma problemlerine yol açması dezavantajıdır (Devran, 2003).

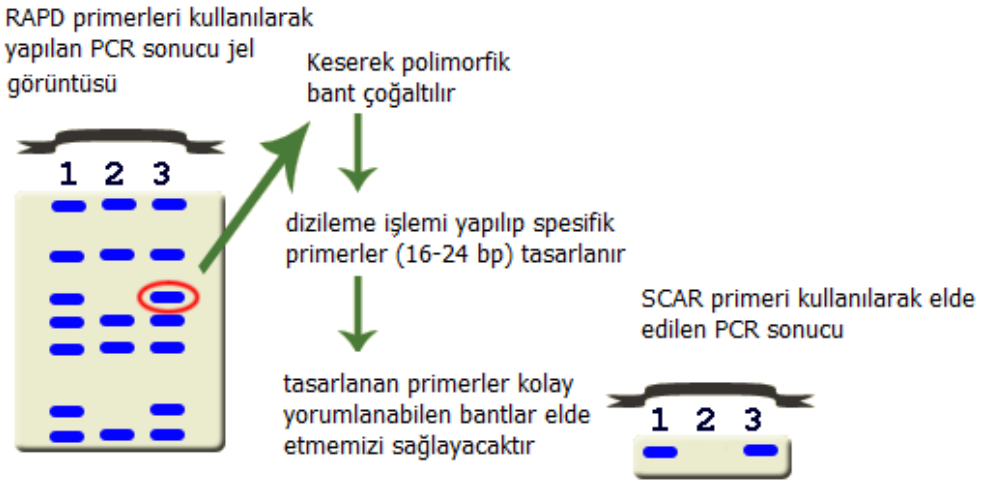
SSR (Simple Sequence Repeats), genomda bulunan 6 bç'den küçük birbiri ardına dizilmiş $(AC)_n$, $(AG)_n$, $(AT)_n$, $(TCT)_n$, $(TTG)_n$, $(TATG)_n$ gibi basit dizi tekrarlarıdır, buradaki n lokustaki tekrar sayılarıdır (Aykut,2007). Bu tekrar dizileri genomun neresinde bulunduğu ve kaç defa tekrarlandığı türden türe değişiklik göstermektedir. Mikrosatelitlerin kenar bölgeleri türler arası korundukları için tekrarlanan bölgeleri

çevreleyen dizilere özgü geliştirilen spesifik primerler SSR'lardır (Şekil 2.9). Hassas, güvenilir ve tekrarlanabilir olması en büyük avantajlarını oluştururur (Olson, Hood, Cantor & Botstein, 1989).



Şekil 2.9. Mikrosatelitlerin uç kısımlarındaki özgü diziler (Olson vd., 1989)

SCAR (Sequence Characterized Amplified Region), ilgilenilen bir özellikle bağlantılı olan çoğaltılmış RAPD fragmentlerinden belirlenmiş nükleotid sekanslarından tasarlanan spesifik 15-30 bç primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmış DNA fragmentleridir (Şekil 2.10). Daha uzun PCR primerlerinin kullanılması, RAPD primerlerde karşılaşılan sorunların azaltılmasını sağlamıştır. SCAR primerlerin en büyük avantajı hızlı ve kullanımı kolay olmasıdır. Buna ek olarak, SCAR'lar tekrarlanabilirlik özelliklerine sahiptir ve lokusa özgüdür, bu özelliği sebebiyle gen haritalama ve markır destekli seleksiyon (MAS) kullanılmıştır. SCAR primerlerini tasarlamak için dizi analizine ihtiyaç duyulması ise dezavantajıdır (Paran & Michelmore, 1992).



Şekil 2.10. SCAR primer üretimi (Olson vd., 1989)

STS (Sequence Tagged Sites), genomda tek bulunan lokasyonu ve baz dizisi bilinen nispeten kısa (200-500 bç) DNA dizisidir. STS bölgeleri, bireyleri ayırt etmek için kullanılabilen genetik belirteçlerdirler. STS kavramı 1989'da Olson ve arkadaşı tarafından ortaya atılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) insan genomu araştırması üzerindeki etkisini değerlendirirken, DNA'da tek kopyası bulunan dizilerin kromozom boyunca genlerin haritalanması için işaretleyiciler olabileceğini fark etmişlerdir (Olson vd., 1989).

Moleküler markırların gelişimi ile birlikte markır destekli seleksiyon (MAS) kullanımı oldukça artmıştır. Özellikle tahıllarda verim, kalite ve hastalıklara dayanıklılık konularında yapılan çalışmalar artmıştır. Klasik ıslah yöntemleri kullanılarak çok uzun zaman alacak ıslah çalışmaları MAS kullanılarak çok daha kısa sürede tamamlanabilmektedir. Örneğin, MAS yardımıyla buğdayda sarı pas, kahverengi pas ve külleme gibi hastalıklara karşı dayanıklılık genlerinin yeni çeşitlere aktarımı sağlanmıştır (Sönmezoğlu, Yıldırım, Güleç & Kandemir, 2010).

Buğday ıslahında moleküler markır destekli seleksiyonun yaygın kullanım alanlarından biri de pas hastalıklarına dayanıklı çeşitlerin oluşturulmasıdır. Üç pasa da dayanıklı buğday çeşidi geliştirmek, her bir pas çeşidine dayanıklılık sağlayan genlerin bir bitkide toplanması, buğday ıslahçılarının hedeflerinden biridir (Sönmezoğlu vd., 2010).

Araştırmacılar MAS kullanımının hastalık dayanıklılık konusunda yürütülen ıslah çalışmalarında çok etkili olduğunu açıklamışlardır. Chen ve ark. 2005'de yaptıkları bir çalışmada markır destekli seleksiyon aracılığıyla kahverengi pasa ve sarı pasa dayanıklılık genlerinin gen piramitleme yöntemi ile bu dayanıklılık genlerinin bir genotipte toplanması sağlanmıştır (Sönmezoğlu vd., 2010). Aynı karaktere etki eden birden fazla genin aynı genotipte birleştirilmesine gen pramidi denilmektedir. Aynı hastalığa dayanıklılık sağlayan farklı genlerin piramitleştirilmesi daha etkin bir dayanıklılık sağlar (Güleç vd., 2010). Moullet ve ark. 2009'da yaptıkları bir çalışmada ise SSR markırları kullanarak kahverengi pasa dayanıklılık sağlayan iki geni (*Lr9* ve *Lr24*) bir buğday hattına aktarmayı başarmışlardır (Sönmezoğlu vd., 2010).

2.7. Kahverengi Pas Dayanıklılığı ile İlişkili Moleküler Markırlar

Yapılan literatür çalışması sonucunda önceden yapılan çalışmalar ışığında çeşitli *Lr* genleri seleksiyonunda kullanabilecek markır listeleri aşağıdaki tabloda verilmiştir (Çizelge 2.1) (Vida vd., 2010).

Çizelge 2.1. *Lr* genlerinin seleksiyonu için kullanılabilecek bazı moleküler markırlar (Vida vd., 2010).

***Lr* geni**	**Markır tipi**	**Markır ismi**
Lr1	RGA	Lr1RGA1
Lr3	cDNA	TaR16
Lr10	Functional	T10Rgal
Lr13	SSR	barc163-2B
Lr14	SSR	gwm344
Lr16	SSR	wmc764
Lr20	STS	STS638
Lr21	Functional	Lr1L/Lr21R
Lr22a	SSR	gwm455
Lr25	SCAR	Lr25F20/Lr25R19
Lr26	PCR-based	P6M12-P
Lr28	SCAR	SCS421570
Lr29	SCAR	Lr29F18/Lr29R18
Lr34	STS	csLV34
Lr35	STS	SR39F2/R3
Lr37	SCAR	BCD260F1/35R2
Lr37	SCAR	SC-Y15F/SC-Y15R
Lr37	CAPS	VENTRIUP/LN2
Lr38	SSR	Wmc773
Lr39	SSR	gwm210
Lr46	STS	XSTS1BL2/XSTS1BL9
Lr47	CAPS	PS10R/PS10L
Lr48	SSR	gwm429b
Lr49	SSR	barc163
Lr50	SSR	gwm382
Lr51	CAPS	S30-13L/AGA7-759R
Lr52	STS	txw200
Lr58	SSR	cfd50
Lr60	SSR	barc149
Lr63	SSR	barc321
Lr64	SSR	barc104

CAPS, çoğaltılmış polimorfik dizi; **RGA**, direnç gen analoğu; **SCAR**, çoğaltılmış ve karakterize edilmiş bölge dizileri; **STS,** işaretli bölge dizileridir.

2.8. Ülkemizdeki Kahverengi Pas ile İlişkili MAS çalışmaları

Ege Üniversitesi'nde yapılan bir doktora çalışmasında CIMMYT (International Maize and Wheat Improvement Center)'ten temin edilmiş her biri farklı *Lr* geni içeren hatlar, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiş kahverengi pasa duyarlı çeşitler arasında yapılan melez sonucu elde edilen F_1 ve F_2 generasyonları üzerinde çalışma yapılmıştır. *Lr13* genine ait AFLP ve SSR markırları araştırılmış ve *Lr13* geni seleksiyonunda başarılı olabilecek markırlar saptamışlardır (Aykut, F.).

Namık Kemal Üniversitesi'nde yapılan bir yüksek lisans tez çalışmasında *Lr9*, *Lr19*, *Lr24, Lr14*, *Lr34* ve *Lr35* dayanıklılık genlerinin markır çalışmaları Eylem Örs tarafından çalışılmış olup *Lr14*, *Lr19*, *Lr34* ve *Lr35* genlerinin seleksiyonunda başarılı olabilecek markırlar saptanmıştır (Eylem Örs, kişisel görüşme, 10 Aralık 2017).

Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde yürütülen TAGEM'in desteklediği 2015 yılında başlatılan bir projede *Lr9* ve *Lr19* dayanıklılık genlerinin markırları çalışılmaktadır. Enstitüye ait 100 buğday çeşidinde bu genlere ait moleküler markırlar kullanılarak tarama yapılmaktadır.

Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde yürütülen 2016 yılında başlatılan TAGEM'in desteklediği başka bir projede ise kahverengi pas Ege bölgesi'nde buğday üretiminin verimini ve kalitesini etkilediği için SSR ve SNP markırları kullanılarak hastalığa dayanıklılık genleriyle (*Lr* genleri) alakalı moleküler çalışmalar yapılmaktadır.

Mehmet Aybeke'nin 2015 yılında Edirne'de yaptığı bir çalışmada kahverengi pasa dayanıklılık sağladığı tespit edilen *Lr9*, *Lr19*, *Lr24* ve *Lr28* genlerinin moleküler markırlarla seleksiyonunun sağlanması için çalışma yapmıştır (Aybeke, 2015).

BÖLÜM 3

3.1. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1.1. Bitki Materyali

Tez çalışmasında kullanılan bitki materyalleri (Şekil 3.1) **I)** Ebeveynler; *Lr* dayanıklılık geni kaynağı Thatcher (Tc*) yakın izogenik hatlar (Tc**Lr9,* Tc**Lr19,* Tc**Lr24) ve* hiçbir *Lr* dayanıklılık genini içermeyen Morocco çeşidi. **II)** Ebeveynler arasında yapılan melezlemeler sonucu elde edilen F_2 generasyonu olan bitkiler (Çizelge 3.1). Melezleme çalışmaları Trakya Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nde tez çalışmasına başlamadan önce gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda Tc*Lr9, Tc*Lr19 Tc*Lr24 hatları teker teker Morocco ile çeşidi melezlenmiştir. Melezleme sonucu elde edilen Morocco x Tc*Lr9, Morocco x Tc*L19, Morocco x Tc*Lr24 kombinasyonlarının her birinden F_2 aşamasında 30 bitki örneği kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan buğdayların tarladan bir görüntüsü

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan bitki örneği sayıları (Tc*Lr9: *Lr9* dayanıklılık genini içeren ebeveyn, Tc*Lr19: *Lr19* dayanıklılık genini içeren ebeveyn, Tc*Lr24*: Lr24* dayanıklılık genini içeren ebeyen, Morocco: Hiçbir dayanıklılık genini içermeyen ebeveyn)

Melezleme kombinasyonları	Taranan F_2 birey sayısı
Morocco x Tc*Lr9	30
Morocco x Tc*Lr19	30
Morocco x Tc*Lr24	30

3.1.2. Hastalık Testleri

Ebeveyn çeşitler ve Melezleme kombinasyonlarından elde edieln F_2 bireyler, kahverengi pas sporları ile inokülasyon yapılarak dayanıklılık özelliklerinin fenotipik olarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından 2015 yılı haziran ayında bölgedeki tarlalardan toplanan kahverengi pas sporları kullanılarak hastalık testi gerçekleştirilmiştir.

Kahverengi pas (*Puccinia recondita* f.sp. *tritici*) inokülasyon protokolü (Plantscience, 2017);

1. Bitkiler viyollere ekilerek 5-6 yapraklı evreye kadar büyütülmüştür.
2. Pas sporları mineral yağ (Soltrol 170, ChemPoint) içinde 10 mg/L olacak şekilde süspanse edilerek üzerine 1ppm Tween-20 yüzey aktif maddesi ilave edilmiştir.
3. Bitkide patojen enfeksiyonunun sağlanması için hazırlanan karışım sprey yardımıyla yaprakların ön ve arka kısımlarına yaklaşık 6cm uzaklıktan püskürtülmüştür.
4. Bitkiler 24-48 saat arası 12^{o}C de, karanlıkta ve %90 nem koşullarında inkübe edilmiştir.
5. Süre sonunda bitkiler normal mevsim koşullarının sağlandığı 16 saat aydınlık, 25^{o}C, %75 nem / 8 saat karanlık, 15^{o}C, %75 nem fotoperiyotta 15-20 gün boyunca gelişmeye bırakılmışlardır. Ancak bitki büyütme kabinindeki mekanik arıza nedeniyle nem problemleri yaşanmış ve kabin içinde manuel yöntemlerle nem oluşturulmaya çalışılmıştır.

15-20 gün sonunda yaprak yüzeyinde üredinosporların gelişip gelişmediği gözlenerek hastalık testleri tamamlanmıştır.

3.1.3. Moleküler Markır Analizleri

Bu tez çalışması için yapılan tüm moleküler analizler, Trakya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümünün Biyoteknoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Tez çalışmasının yürütüldüğü laboratuvar

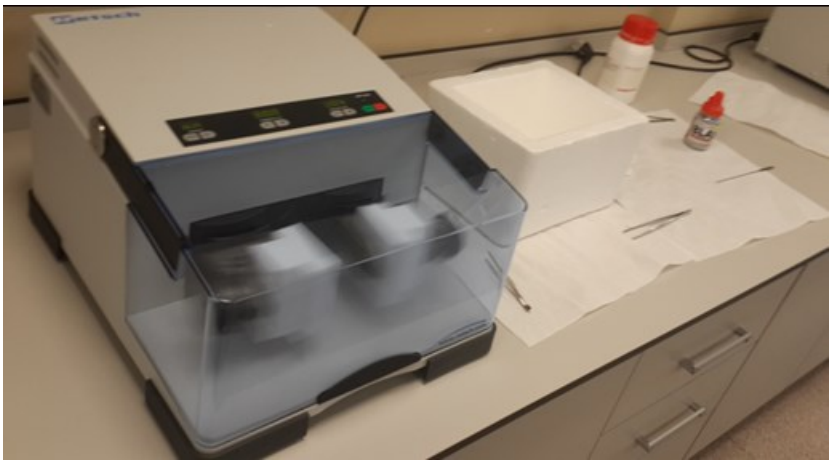
3.1.3.1. DNA izolasyonu

Tarla koşullarında yetiştirilen bitki materyaline ait fidelerden her bir bitki için yaklaşık 200mg yaprak dokusu gerekli etiketlemeler yapılarak 2ml'lik tüpler içerisine alınmış sıvı azotta dondurulup DNA izolasyonu yapılana kadar -20^{o}C'de muhafaza edilmiştir.

Bitki materyaline ait yapraklardan genomik DNA'ları (gDNA) aşağıda detayları verilen Weining and Langridge (1991) yöntemi kullanılarak izole edilmiştir.

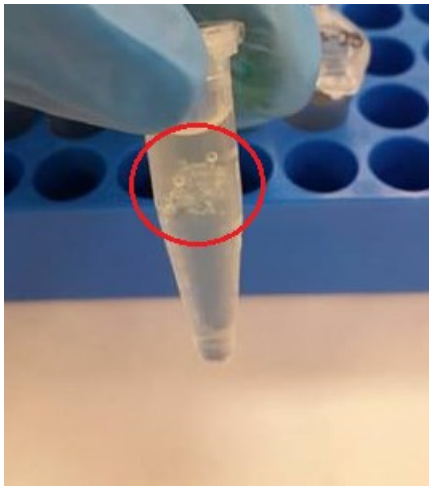
1. -20^{o}C'de muhafaza edilen 200mg bitki dokusu, sıvı azot içerisine alınmıştır. Her bir tüpün içerisine 10 mg PVP ve 3mm metal bilye ilave edilip sıvı azot yardımıyla iyice

toz haline gelene dek doku parçalayıcısında (RETSCH MM400) parçalanmaları sağlanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Bitki dokularının parçalanması

2. Parçalanan bitki dokuları üzerine 600µl ezme tamponu (0,1 M Tris-HCL [pH 8], 10mM EDTA [pH 8], %2 SDS) eklenip, tamamen homojen hale gelene kadar tüpler alt üst edilerek karıştırılmıştır.
3. Ezme tamponu ile homojen hale getirilen bitki dokuları, proteinler ve diğer moleküllerle kompleks halinde bulunan DNA'nın serbest hale geçmesini sağlamak için 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
4. Her örneğin üzerine 600µl soğuk fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ilave edilip 20-30 defa tüplerin ters-yüz edilmesiyle karışmaları sağlanmıştır.
5. Örnekler 13000rpm'de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edilerek hücre artıkları ve proteinlerin bulunduğu fenollü kısım DNA'nın çözüldüğü sulu fazdan ayrılmaları sağlanmıştır.
6. Santrifüj sonrası oluşan DNA'nın bulunduğu üst faz (supernatant) her örnek için faz ayırımlarına dikkat edilerek temiz yeni 1.5 ml'lik tüplere alınmış ve üzerine 600µl kloroform ilave edilmiştir. İyice karışması için tüp ters yüz edilmiştir.
7. Örnekler tekrardan 13000rpm'de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edilmiştir.
8. Santrifüj sonrasında DNA'yı içeren üst faz her örnek için yeni 1.5ml'lik tüplere alınarak üzerine 50µl 3M soğuk sodyum asetat ilave edilip 2-3 kere ters yüz edilerek karıştırılmıştır. Ardından DNA'yı çöktürmek için 1ml soğuk %99 ethanol ilave edilerek 5-10 defa ters yüz edilmiştir (Şekil 3.4).
9. Örnekler -20^{o}C'de DNA'ların yoğunlaşması için en az 30 dakika bekletilmiştir.



Şekil 3.4. Soğuk ethanol içerisinde yoğunlaşan DNA ve RNA molekülleri

10. Süre sonunda örnekler 13000rpm'de +4^{o}C 20 dakika santrifüj edilmiştir.
11. Santrifüj sonrası DNA'lar tüplerin dibinde pellet halinde çöktürüldüğünden dolayı üst sıvı atılarak pelletlerin üzerine soğuk 1ml %75 ethanol eklenerek pelletler yıkanmıştır.
12. Yıkama sonrası tüplerin üstündeki sıvıların dökülüp, pelletlerin kurumaları için tüpler oda sıcaklığında kurutma kâğıdı üzerine ters çevrilerek bırakılmıştır. Tüpler içerisindeki tüm alkol uçana kadar pelletler kurutulmuştur.
13. Kuruyan pelletlerin (DNA'ların) üzerine 50µl steril distile su eklenerek pelletlerin çözünmeleri sağlanmıştır.
14. RNA kontaminasyonunu elimine etmek için örneklerin üzerine 2µl RNaz A enzimi eklenerek 37^{o}C'de 30 dakika bekletilmiştir.
15. RNaz A'nın inaktivasyonu için örnekler 65^{o}C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.

3.1.3.2. DNA miktar ve kalite tayini

İzolasyon işlemi tamamlanmış örneklerin OPTİZEN NanoQ Spektrofotometre cihazı kullanılarak gDNA miktar tayini yapılmıştır. Her örnekten 2µl alınıp cihazın okuma bölmesine yerleştirilmiş ve 260 nm dalga boyunda ölçümünü yaparak örneğin µl'sinde bulunan ng cinsinden DNA miktarı belirlenmiştir. Ayrıca protein kontaminasyonu olup olmadığını belirlemek için de OD_{260}/OD_{280} oranına bakılmıştır. OD_{260}/OD_{280} oranı yaklaşık 1.8 olan örneklerin protein kontaminasyonu içermediği varsayılmıştır.

İzole edilen gDNA'ların kalite tayinini yapmak için agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır. Her örnekten yaklaşık 500-800 ng gDNA, son hacim 15µl olacak şekilde distile su ve yükleme boyası (loading dye) ilavesi ile hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler %0,8 konsantrasyonlu, 3µg/ml EtBr (Etidyum Bromür) içeren agaroz jele yüklemesi yapılarak 120V, 80mA akımda yarım saat yürütülmüştür. Elektroforez işlemi tamamlandıktan jel görüntüleme cihazı kullanılarak UV ışığı altında gDNA'lar görüntülenmiştir.

3.1.3.3. Moleküler Markır çalışmaları

Tez çalışmasında *Lr9*, *Lr19* ve *Lr24* dayanıklılık genlerinin belirlenmesinde kullanılan aday markırlar literatürde bulunan çalışmalar incelenerek belirlenmiştir. Her bir dayanıklılık geni için seçilen markırlar ve kullanılan kaynaklar Çizelge 3.2 'da sunulmuştur.

Çizelge 3.2. Her bir dayanıklılık geni için literatürden bulunan markırlar

Gen	Markır	Forward primer dizisi (5'-3')	Reverse primer dizisi (5'-3')	Referans
Lr9	J13 (STS)	CCACACTACCCCAAAGAGACG	TTCTTTTATTCCGCACGCCGG	(Nocente, Gazza & Pasquini, 2007)
	SCS5 (STS)	TGCGCCCTTCAAAGGAGG	TGCGCCCTTCTGACCTGTAT	(Moullet, Fossati, Mascher, Guadagnolo & Schori, 2009)
	OPA19 (RAPD)	CAAACGTCGG	-	(Dhillon & Dhaliwal, 2011)
	OPD12 (RAPD)	CACCGTATCC	-	(Dhillon & Dhaliwal, 2011)
Lr19	GbF/GbR (STS)	CATCCTTGGGGACCTC	CCAGCTCGCATACATCCA	(Blaszczyk vd., 2004)
	S253 (SCAR)	GCTGGTTCCACAAAGCAAA	GGCTGGTTCCTTAGATAGGTG	(Gupta vd., 2006a)
	S265 (SCAR)	GGCGGATAAGCAGAGCAGAG	GGCGGATAAGTGGGTTATGG	(Gupta vd., 2006a)
	Xwmc221 (SSR)	ACGATAATGCAGCGGGGAAT	GCTGGGATCAAGGGATCAAT	(Gupta vd., 2006a)
Lr24	H51/H52 (STS)	AGTCGTCCCCGAAGACCCGCTGGA	TCGTCCCCTGATGCCATGTAATGT	(Nocente vd., 2007)
	J09/1-J09/2 (STS)	TCTAGTCTGTACATGGGGGC	TGGCACATGAACTCCATACG	(Blaszczyk vd., 2004)
	$SCS73_{719}$ (SCAR)	TCGTCCAGATCAGAATGTG	CTCGTCGATTAGCAGTGAG	(Gupta, Charpe, Koul, Prabhu & Haq, 2005)

Her bir markır için gerçekleştirilen PCR reaksiyonlarının içeriği Çizelge 3.3'de sunulmuştur.

Çizelge 3.3. Tüm markırlar için kullanılan PCR koşulları

Materyaller	**Reaksiyon karışımındaki konsantrasyon**
Kalıp DNA	50ng
PCR Buffer	1x
$MgCl_2$	2.5mM
dNTP karışımı	0.2mM
Primer- Forward	10pmol
Primer- Reverse	10pmol
Taq DNA Polimeraz	1U
Distile su	-
BSA	2mg/ml

Çizelge 3.4. Tüm markırlar için kullanılan PCR basamakları, (3. Adımdaki bağlanma sıcaklığı her primerin Tm değerine göre ayarlanmıştır).

Basamak	**Sıcaklık (°C)**	**Süre**	**Döngü (Cycle)**
1	94	4 dakika	1
2	94	1 dakika	35
3	55-65 (Tm)	1 dakika	
4	72	1 dakika	
5	72	5 dakika	1

Çizelge 2'de verilen PCR koşulları tüm markırlarda kendi içinde optimize edilerek, Çizelge 3.4'de verilen PCR basamakları her primerin bağlanma sıcaklığı ayarlanarak (Tm) PCR gerçekleştirilmiştir. RAPD primerlerin Tm değerleri istisnadır ve 36^{o}C'dir.

PCR sonucu çoğaltılan DNA fragmentlerini analiz etmek için önce örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür, jel elektroforezinde ayırıcı DNA fragmenti gözlenen markırlar daha detaylı inceleme için Advance Analytical Fragment Analyzer kapiller elektroforezine yüklenerek analiz edilmiştir.

SCS5 markırı optimizasyon çalışmalarına rağmen Çizelge 3.3'deki koşullarda çalıştırılamamıştır ancak Çizelge 3.5'de verilen ThermoFisher PCR Master Mix (2x) kullanılarak yapılan PCR koşulları sonucunda çalıştırılabilmiştir.

Çizelge 3.5. PCR Master Mix kullanılarak yapılan PCR karışımı

Materyaller	**Reaksiyon karışımındaki konsantrasyon**
Kalıp DNA	50 ng
PCR Master Mix (2x)	X
Primer- Forward	10pmol
Primer- Reverse	10pmol
Distile su	-

3.1.3.4. Kapiller elektroforez analizi

Kapiller elektroforezin temel ilkesi jel elektroforezine dayanır ve elektrik akımında yüklü DNA fragmentlerinin boyutlarına göre ayrılmalarını sağlar. Fakat jel elektroforezine göre çok hassas sonuçlar vererek 2bç'e kadar farklılık gösteren DNA fragmentlerini birbirinden ayırır. PCR ile çoğaltılan DNA fragmentlerinin daha kesin ayrımı ve çoğaltılan fragmentlerin büyüklüğünün daha kesin biçimde ortaya konması için PCR ürünleri kapiller elektroforez cihazında analiz edilmiştir.

Advance Analytical Fragment Analyzer kapiller elektroforez cihazı kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Cihaza özgü kitler kullanılarak, 1-500bç arasındaki DNA fragmentlerini analiz etmemizi sağlayan DNF-905 dsDNA Reagent Kit, 35-1500bç arasındaki DNA fragmentlerini analiz etmek için de DNF-910 dsDNA Reagent Kit kullanılmıştır. Kitin içerisinde bulunan malzemelerin (Çizelge 3.6) her birinin kitin kullanım protokolüne göre hazırlıkları yapılarak cihaza yüklemeleri yapılmıştır. Seperation Gel, Inlet Buffer, Conditioning Solution ve Upper/Lower Marker, kitkullanım klavuzunda önerildiği biçimde hazırlanarak cihaza uygun şekilde yerleştirilmiştir. PCR

ürünleri kit ile birlikte temin edilen Dilution Buffer kullanılarak 1/5 oranında sulandırılmış ve 96'lık plate'lere yerleştirilmiştir. Her kuyucukta 24µl son hacim olacak şekilde sulandırılan PCR ürünlerinin yer aldığı her 12'lik sıraya 24 µl, 1-500 bç (veya 35-1500 bç) "ladder" yerleştirilmiştir.12 kapillere sahip olan cihaz her 12'lik sırayı aynı anda elektroforez yapmaktadır. Bu nedenle her sırada analiz edilecek DNA fragmentelerinin boyutuna uygun bir "ladder"da PCR ürünleri ile birlikte cihaza yüklenmektedir. PCR ürünleri ve "ladder" plate yerleştirildikten sonra buharlaşmanın olmaması için kuyuların üstü mineral yağ ile kaplanmıştır. Hazırlanan plate'in cihaza yerleştirilip gerekli ayarlar yapıldıktan sonra örneklerin elektroforezişlemi başlatılmıştır. 55 cm'lik 0,5 µm^lik kapiller içinde 9,0 kV, elektrik akımı uygulanarak 80,0 dakika elektroforez gerçekleştirilmiş ve örneklerde yer alan DNA fragmentleri birbirinden ayrılmıştır.

Çizelge 3.6. Kapiller elektroforezinde kullanılan kitlerin içeriği

Kit İçeriği
dsDNA Separation Gel
Intercalating Dye
5x dsDNA Inlet Buffer
5x Capillary Conditioning Solution
Upper/Lower Markers
DNA Ladder
Mineral Oil
1x Dilution Buffer

3.2. BULGULAR

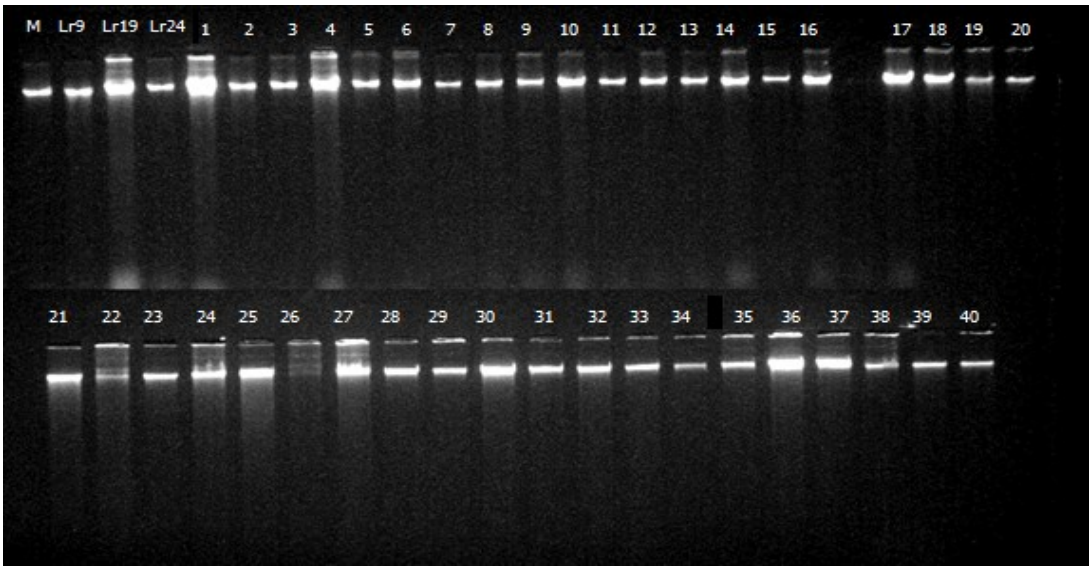
3.2.1 Hastalık Testleri

2015 yılında Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından Trakya Bölgesi'ndeki tarlalardan toplanan kahverengi pas sporları kullanılarak yapılan *in vitro* hastalık testleri başarılı olmamıştır. Kullanılan bitki büyütme kabininde yaşanan teknik arıza nedeniyle nem kontrolünün sağlanamaması sorunun temelini oluşturmuştur. Pas sporlarının enfeksiyon oluşturmasındaki en önemli koşullardan biri olan yüksek nem oranı sağlanamamış ve harici nem sağlama çabaları da sorunu çözmemiştir. Hassas çeşit olan Morocco'da da pas enfeksiyonu gerçekleşmediği için yapılan yapay inokülasyonun başarısız olduğu kanaatine varılmıştır. Laboratuvar koşullarında enfeksiyon

gerçekleştirilemediğinden tarladaki buğday örneklerinde pas enfeksiyonu gerçekleşmesi beklenmiş, bu yüzden tez çalışmasında kullanılan bitki örnekleri tarladaki F_2 generasyon bitkiler olarak değiştirilmiştir. Sık sık tarlaya gidip bitkilerden gözlem alınmasına rağmen, bitkilerde de enfeksiyona rastlanamamıştır. Bu durumun civar tarlaların ilaçlanmasından kaynaklı olabileceği ve kullanılan fungusitin örneklerin yetiştirildiği tarlayı da etkilemiş olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle moleküler markırlarla elde edilen seleksiyon sonuçları hastalık testleri ile doğrulanamamıştır. Ancak bir sonraki yıl seçilen bireylerden elde edilen F_3 generasyonunda bu doğrulamanın gerçekleştirilmesi planlanmaktadır.

3.2.2. Genomik DNA İzolasyonu

Tez çalışmasında kullanılan tüm bitki materyalinin yaprak dokularından örnek alınarak gDNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen gDNA'lar ortalama minimum 350 ng/µl ve maksimum 1500 ng/µl konsantrasyon aralığında elde edilmiştir. gDNA'ların kalite analizi için yapılan jel elektroforezinde tüm örneklere ait gDNA'ların saf ve kırılmamış olduğu gözlenmiş (Şekil 3.7) ve 25 ng/µl olacak şekilde sulandırılarak moleküler markır analizlerinde kullanılmıştır.

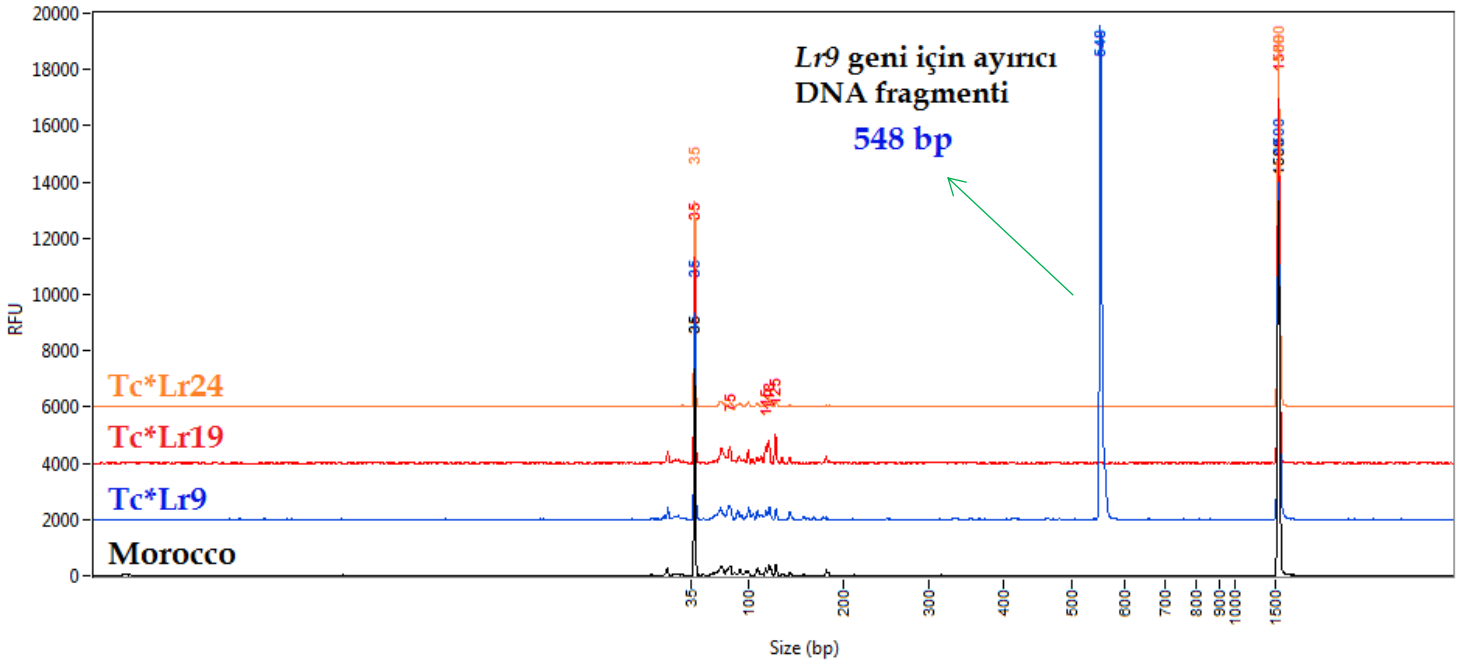


Şekil 3.5. Bitki dokularından izole edilen bazı gDNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü (**M:** Morocco, **Lr9:** Tc*Lr9, **Lr19:** Tc*Lr19, **Lr24:** Tc*Lr24, 1-40 numaralı örnekler: F_2 generasyondaki bitki gDNA'larıdır.)

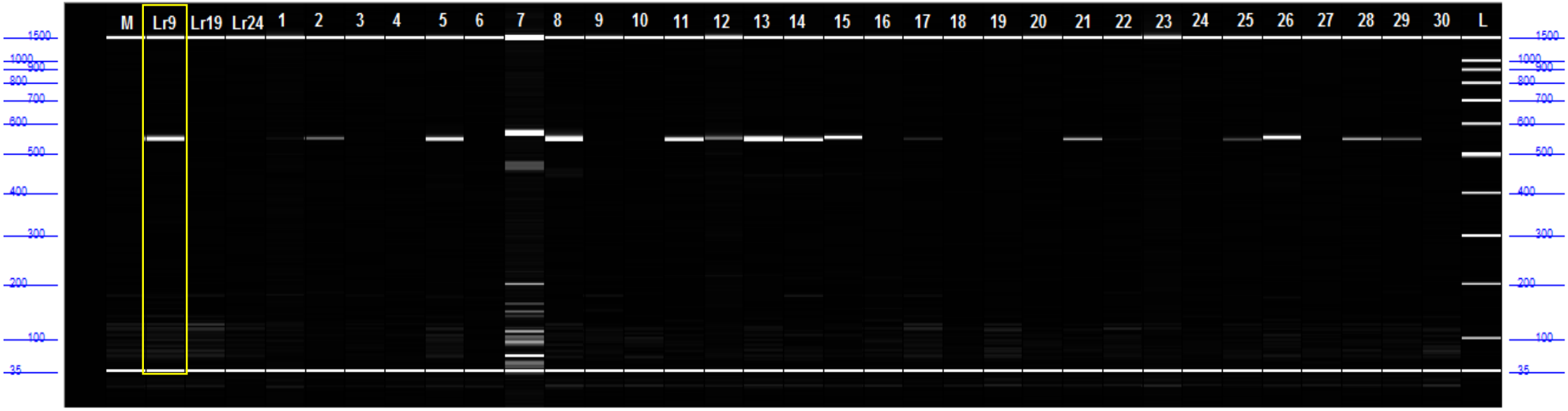
3.2.3. *Lr9* Geni İçin Kullanılan Markır Sonuçları

3.2.3.1. SCS5 markırı

SCS5 markırı ile ebeveyn bitki materyalinde yapılan PCR sonucu sadece Tc*Lr9 hattında 548 bç büyüklüğünde bir DNA fragmenti elde edilmiştir (Şekil 3.6). Morocco x Tc*Lr9 kombinasyonundan elde edilen 30 F_2 bireyinde yapılan taramada bu DNA fragmentinin çoğaltıldığı bireyler dayanıklı genotipler olarak değerlendirilmiştir. Bu DNA fragmentinin çoğaltılmadığı bireyler ise *Lr9* genini içermeyen genotipler olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.6. SCS5 markırı ile yapılan PCR sonucu, 548 bç boyutundaki DNA fragmenti *Lr9* geni için ayırıcı olarak gözlenmiştir

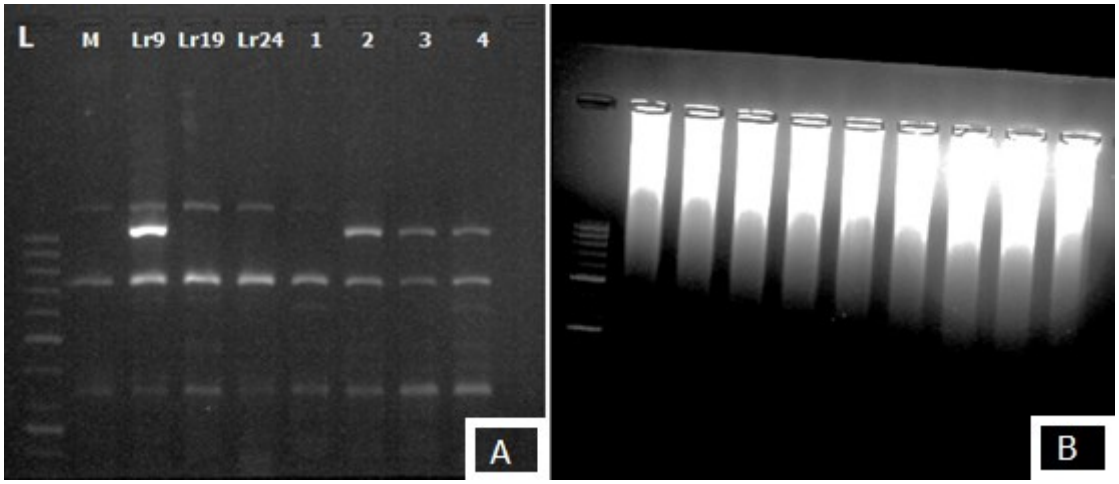


Şekil 3.7. Ebeveynler ile Morocco x Tc*Lr9 melezinden elde edilen F_2 bireylerinde SCS5 markırı ile tarama.

(**M**: Morocco **Lr9:** Tc*Lr9 **Lr19:** Tc*Lr19 **Lr24:** Tc* Lr24 **L:** Ladder. Yukarıda 1-30 arası numaralandırılmış bireyler Morocco x Tc*Lr9 melezinin F_2 bireyleri. Kapiller sonucuna göre 2, 5, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 21, 25, 26, 28, 29 numaralı bireyler *Lr9* geni içeren genotipler olarak belirlenmiştir)

3.2.3.2. J13 markırı

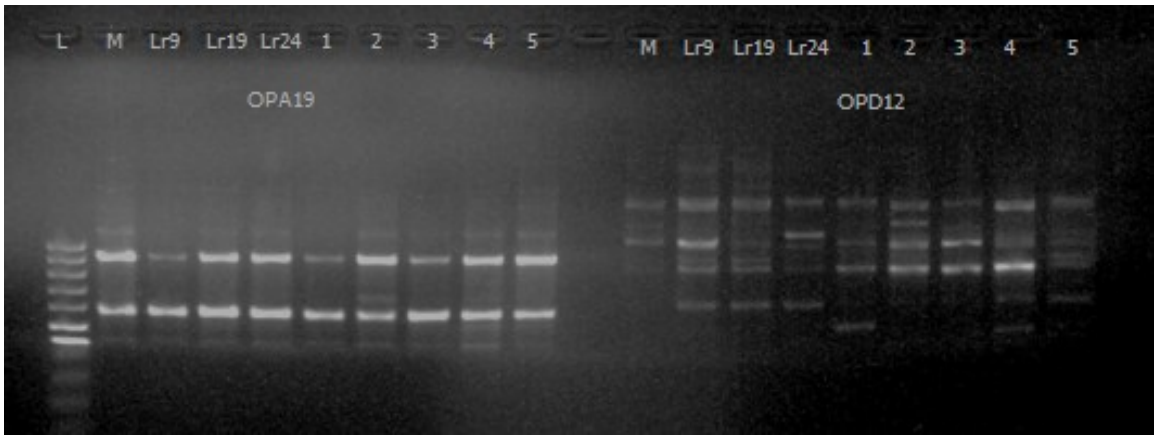
Literatürde *Lr9* dayanıklılık genin seleksiyonunda kullanılabileceği raporlanmış olan J13 markırı ile yapılan ilk çalışmada 1100bç büyüklüğünde bir DNA fragmenti *Lr9* geni için ayırıcı olarak gözlemlenmiştir. Fakat Tc*Lr9 x Morocco melezlerinden elde edilen 30 bitki örneğinde bu markırla çalışıldığında sağlıklı bir sonuç elde edilememiştir. Çeşitli optimizasyon çalışmaları hatta primerin tekrar sentez ettirilmesi dahi sorunu çözmemiş, ilk deneme de elde edilen sonuç tekrar elde edilememiştir. Tüm denemelerde yoğun bir smear görüntüsü (Şekil 3.8) dışında hiç DNA fragmenti çoğaltılamamıştır.



Şekil 3.8. J13 markırı ile yapılan PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri A: İlk deneme de elde edilen başarılı sonuç B: Daha sonraki F2 bireyelrin taranması sırasında elde edilen smear görüntüsü (**L:** Ladder, 50Bç GeneRuler, **M:** Morocco, **Lr9:** Tc*Lr9, **Lr19:** Tc*Lr19, **Lr24:** Tc*Lr24, **1-2-3-4:** Morocco x Tc*Lr9 melezinin F_2 bireyleri)

3.2.3.3. OPA19 ve OPD12 markırları

OPA19 ve OPD12 markırları ile yapılan PCR sonucunda elde edilen jel görüntüsünde *Lr9* dayanıklılık geninin seleksiyonunda kullanılabilecek spesifik bir DNA fragmentinin olmadığı görülmüştür (Şekil 3.9).

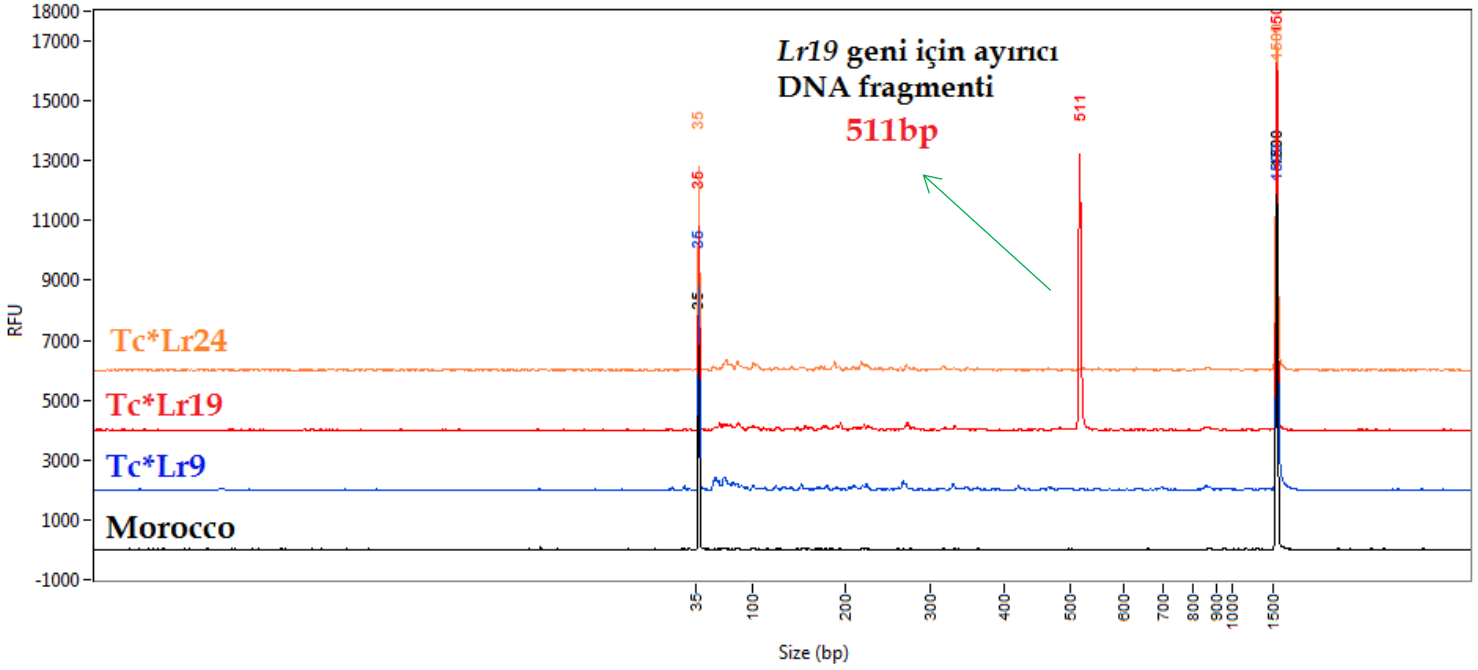


Şekil 3.9. OPA19 ve OPD12 markırları ile yapılan PCR ürünlerinin jel görüntüsü (**L:** Ladder, 50Bç GeneRuler, **M:** Morocco, **Lr9:** Tc*Lr9, **Lr19:** Tc*Lr19, **Lr24:** Tc*Lr24, **1-2-3-4-5:** Morocco x Tc*Lr9 melezinin F_2 bireyleri)

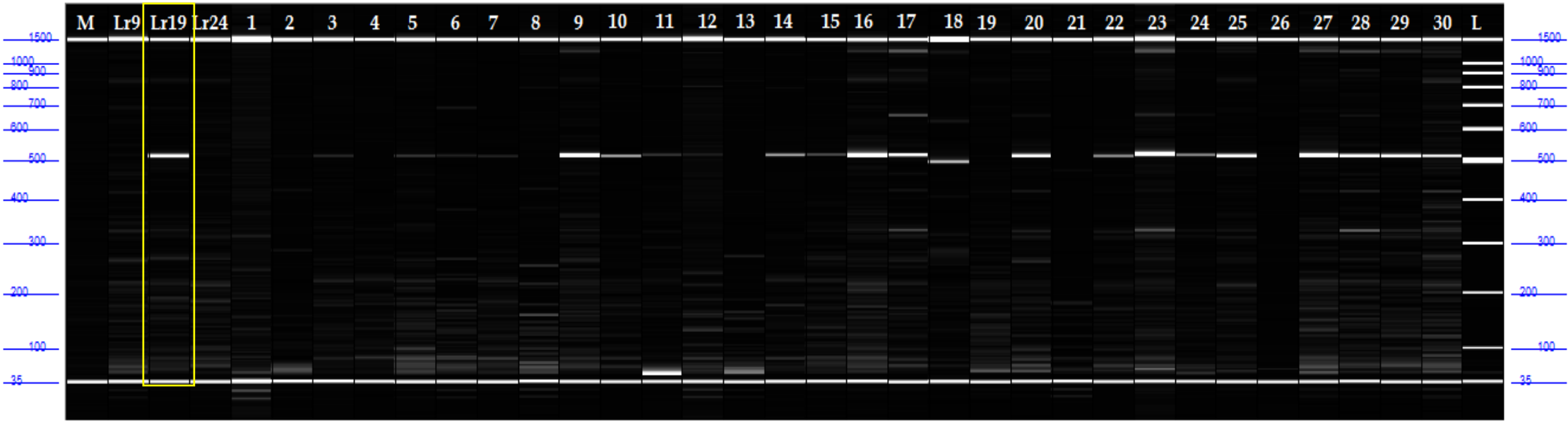
3.2.4. *Lr19* Geni İçin Kullanılan Markır Sonuçları

3.2.4.1. S265 markırı

S265 markırı ile ebeveyn bitki materyalinde yapılan PCR sonucu sadece Tc*Lr19 hattında 511 bç büyüklüğünde bir DNA fragmenti elde edilmiştir (Şekil 3.10). Dolayısıyla SCS265 markırı ile Morocco x Tc*Lr19 melez kombinasyonundan elde edilen F_2 bireylerinde de aynı DNA fragmenti gözlenen bireylerin *Lr19* dayanıklılık genini içerdiği öngörülmüştür. 511 bç DNA fragmenti gözlenmeyen bireyler ise *Lr19* genini içermeyen örneklerde ise bireyler olarak yorumlanmıştır (Şekil 3.11).



Şekil 3.10. SCS265 markırı ile yapılan PCR sonucu, *Lr19* geni için ayırıcı olan DNA (511 bç) fragmentinin kapiller elektroforezdeki pik görüntüsü

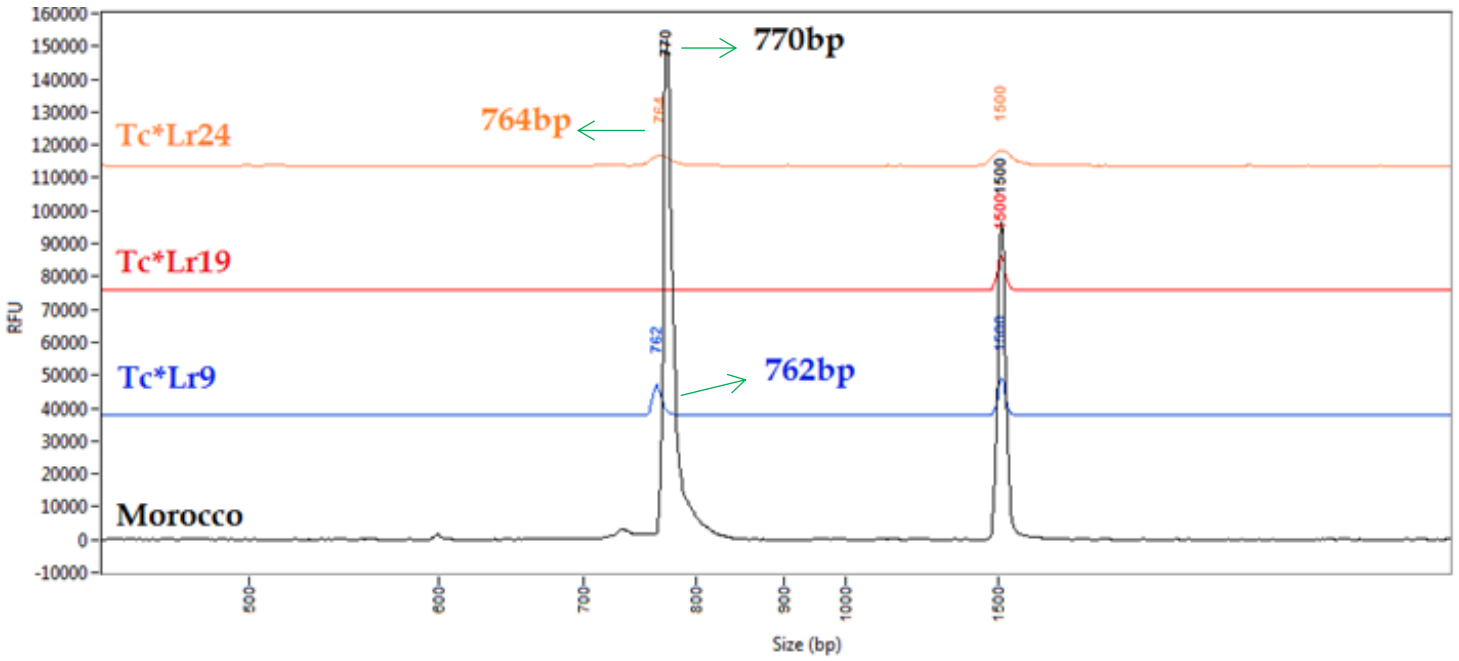


Şekil 3.11. Ebeveynler ve Morocco x Tc*Lr19 melezinden elde edilen F_2 bireylerinde SCS265 markırı tarama.

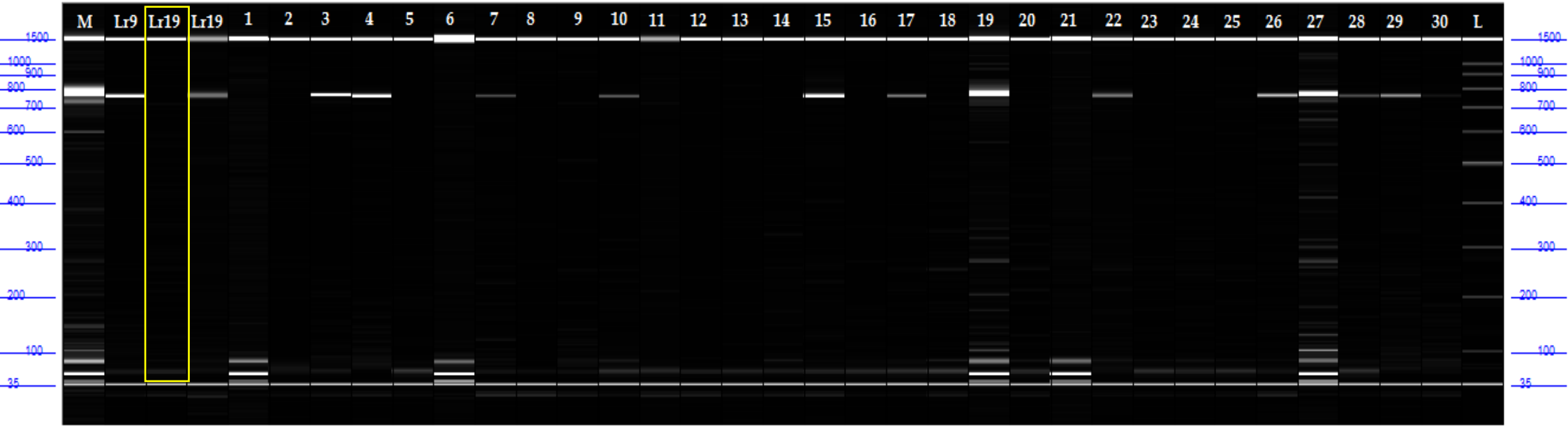
(**M**: Morocco **Lr9:** Tc*Lr9 **Lr19:** Tc*Lr19 **Lr24:** Tc* Lr24 **L:** Ladder. 1-30 arası numaralandırılmış bireyler Morocco x Tc*Lr19 melezinin F_2 bireyleri. Kapiller sonucuna göre 9, 10, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 30 numaralı bireyler *Lr19* geni içeren genotipler olarak belirlenmiştir.)

3.2.4.2. SCS253 markırı

SCS253 markırı ile ebeveynlerde yapılan PCR sonucunda; diğer markırların aksine; *Lr19* dayanıklılık genini içermeyen genotiplerde 762-770 bç aralığında DNA fragmentleri görülmüştür (Şekil 3.12). Bunun bir negatif seleksiyon markırı olabileceği yorumlanmış ve Morocco x Tc*L19 melez kombinasyonundan elde edilen F_2 bireylerde tarama yapılmıştır. Bu tarama sonucunda 770 bç DNA fragmenti çoğaltılmayan bireyler *Lr19* geni içeren genotipler olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.13). Bu genotiplerden elde edilecek F_3 bireylerde taramanın tekrarlanması ve hastalık testleri ile sonuç doğrulanacaktır.



Şekil 3.12. SCS253 markırı ile yapılan PCR sonucunda diğer markırlardan farklı olarak elde edilen ayırıcı olan DNA fragmenti (762-770 bç) *Lr19* geni içermeyen bireylerde gözlenmiştir.

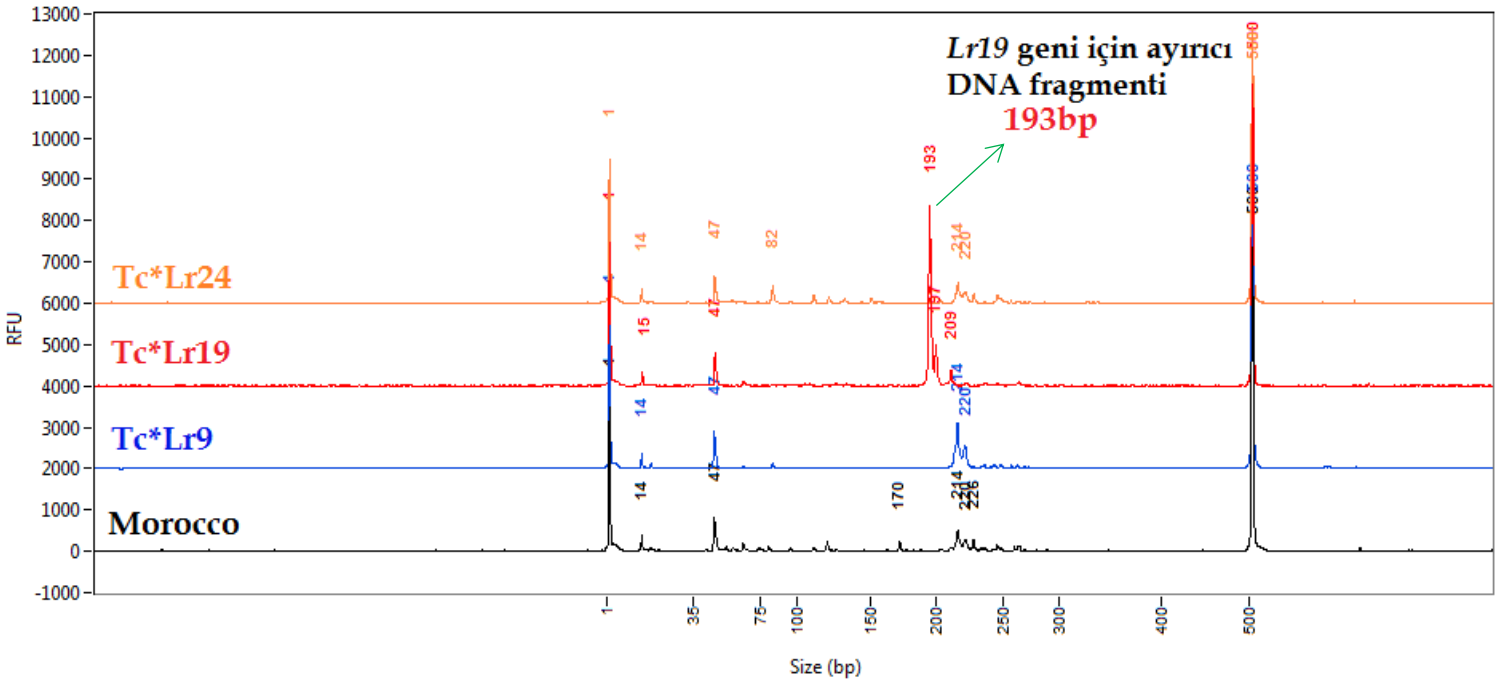


Şekil 3.13. Ebeveynler ve Morocco x Tc*Lr19 melezinden elde edilen F_2 bireylerinde SCS253 markırı tarama

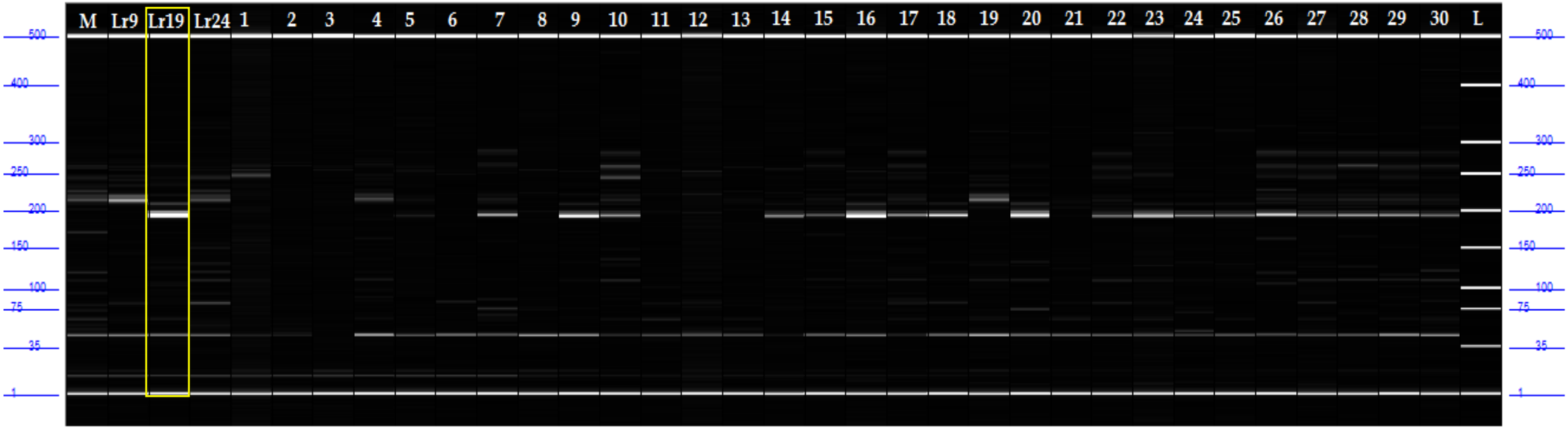
(**M**: Morocco **Lr9:** Tc*Lr9 **Lr19:** Tc*Lr19 **Lr24:** Tc* Lr24 **L:** Ladder. Yukarıda 1-30 arası numaralandırılmış bireyler Morocco x Tc*Lr19 melezinin F_2 bireyleri. Kapiller sonucuna göre 3, 4, 7, 10, 15, 17, 19, 22, 26, 27, 28, 29, 30 numaralı bireyler *Lr19* geni içermeyen genotipler olarak belirlenmiştir)

3.2.4.3. Xwmc221 markırı

Xwm221 markırı ile ebeveynlerde yapılan PCR sonucunda; *Lr19* dayanıklılık genini içeren Tc*Lr19 da 193 bç büyüklüğünde bir DNA fragmentleri çoğaltılmış diğer ebeveynler de ise 214 bç büyüklüğünde bir DNA fragmenti elde edilmiştir (Şekil 3.17). Morocco x Tc*Lr19 melez kombinasyonundan elde edilen 30 F_2 bireyinde yapılan taramada bu DNA fragmentinin çoğalttığı bireyler dayanıklı genotipler olarak değerlendirilmiştir. Bu DNA fragmentinin çoğaltılmadığı bireyler ise *Lr19* genini içermeyen genotipler olarak yorumlanmıştır (Şekil 3.18).



Şekil 3.14. Xwmc221 markırı ile yapılan PCR sonucunda, *Lr19* geni için ayırıcı olan DNA (193 bç) fragmentinin kapiller elektroforezdeki pik görüntüsü

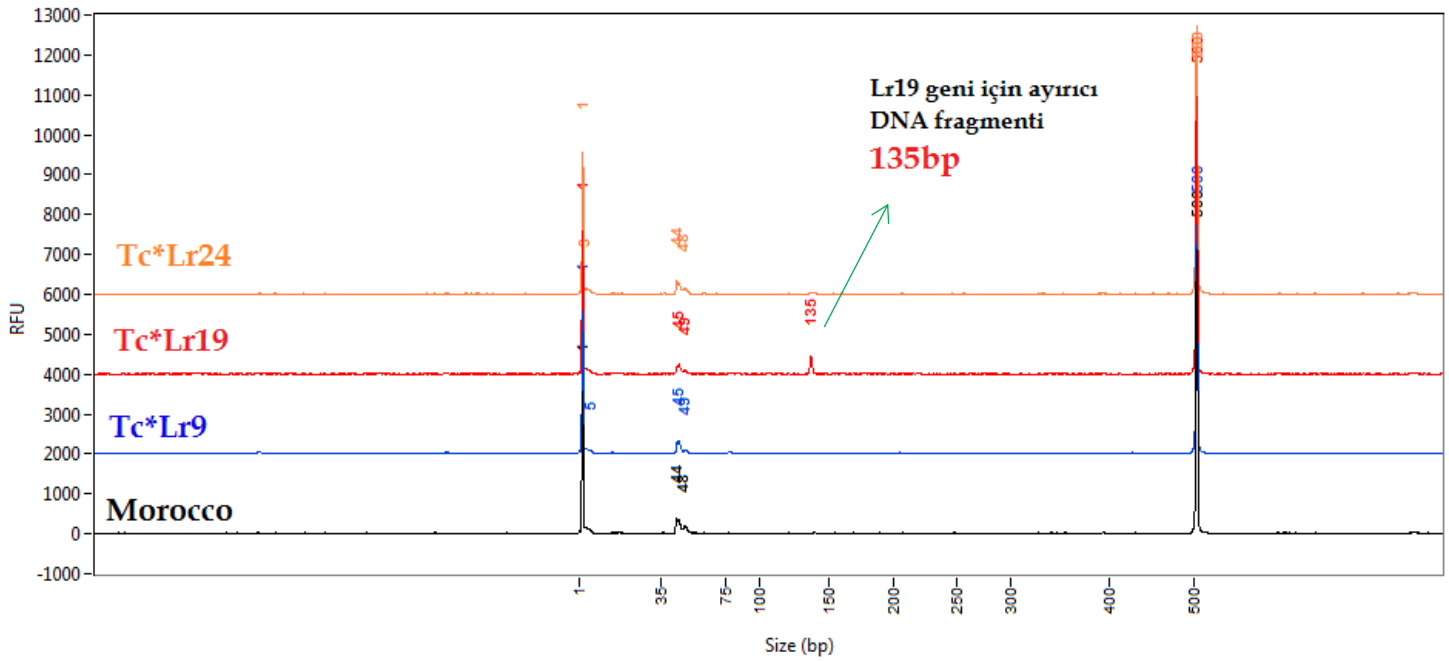


Şekil 3.15. Ebeveynler ve Morocco x Tc*Lr19 melezinden elde edilen F_2 bireylerinde Xwmc221 markırı tarama

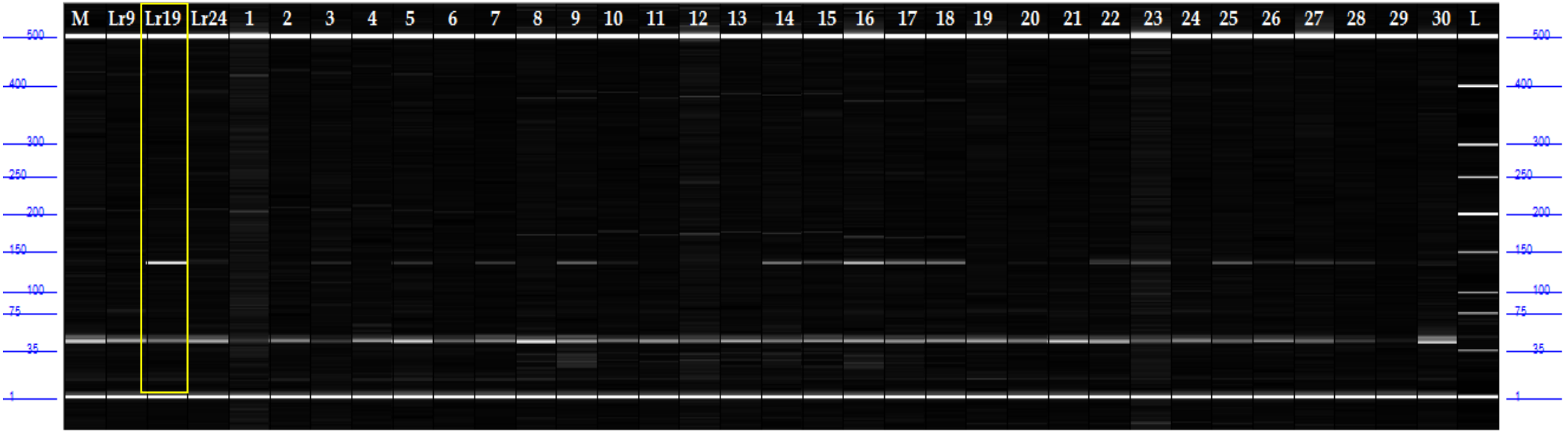
(**M**: Morocco **Lr9:** Tc*Lr9 **Lr19:** Tc*Lr19 **Lr24:** Tc* Lr24 **L:** Ladder. Yukarıda 1-30 arası numaralandırılmış bireyler Morocco x Tc*Lr19 melezinin F_2 bireyleri. Kapiller sonucuna göre 7, 9, 10, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 numaralı bireyler *Lr19* geni içeren genotipler olarak belirlenmiştir)

3.2.4.4. GbF/GbR markırı

GbF/GbR markırı ile ebeveynlerde yapılan PCR sonucunda; *Lr19* dayanıklılık genini içeren Tc*Lr19'da 135 bç büyüklüğünde bir DNA fragmenti elde edilmiştir (Şekil 3.16). Morocco x Tc*Lr19 melez kombinasyonundan elde edilen 30 F_2 bireyinde yapılan taramada bu DNA fragmentinin çoğaltıldığı bireyler dayanıklı genotipler olarak değerlendirilmiştir. Bu DNA fragmentinin çoğaltılmadığı bireyler ise *Lr19* genini içermeyen genotipler olarak yorumlanmıştır (Şekil 3.17).



Şekil 3.16. GbF/GbR markırı ile yapılan PCR sonucunda, *Lr19* geni için ayırıcı olan DNA (135 bç) fragmentinin kapiller elektroforezdeki pik görüntüsü



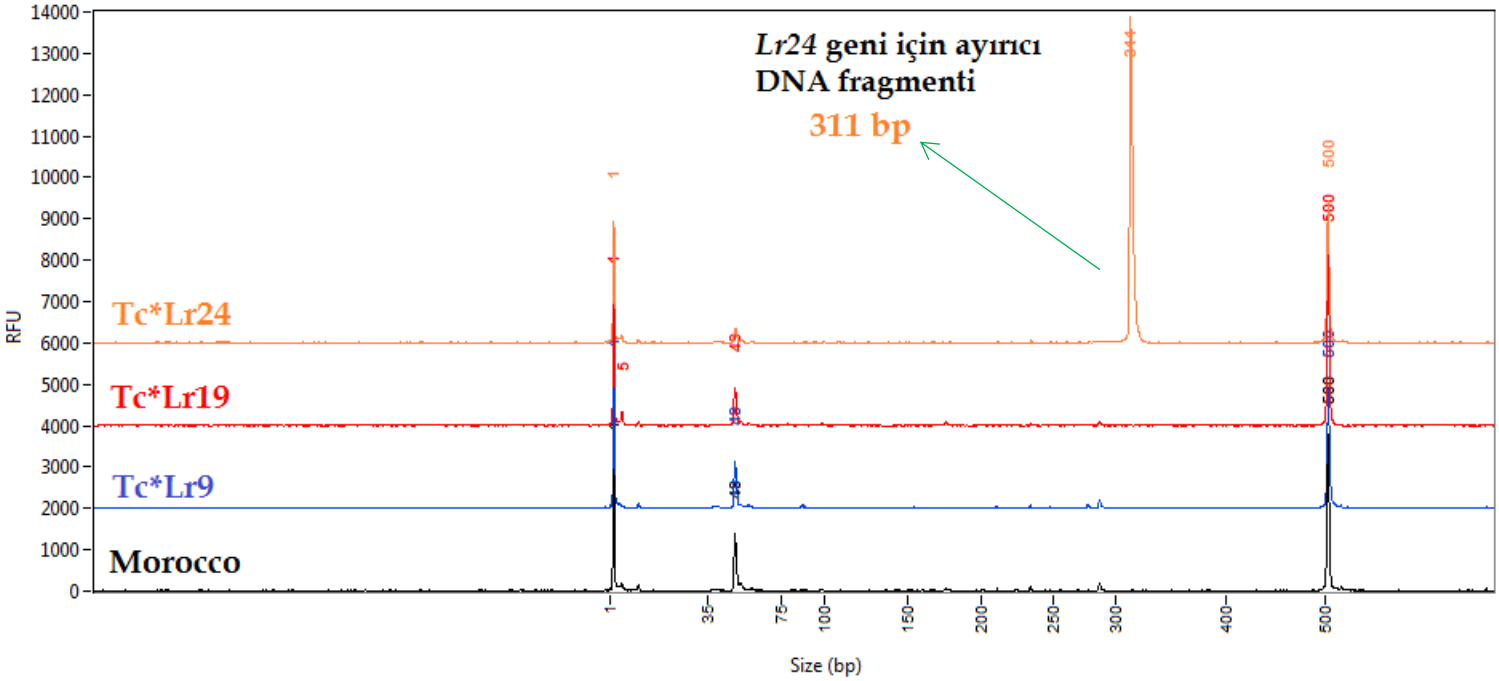
Şekil 3.17. Ebeveynler ve Morocco x Tc*Lr19 melezinden elde edilen F_2 bireylerinde GbF/GbR markırı tarama

(**M**: Morocco **Lr9:** Tc*Lr9 **Lr19:** Tc*Lr19 **Lr24:** Tc* Lr24 **L:** Ladder. Yukarıda 1-30 arası numaralandırılmış bireyler Morocco x Tc*Lr19 melezinin F_2 bireyleri. Kapiller sonucuna göre 5, 7, 9, 14, 15, 16, 17, 18, 22, 23, 25, 26, 27, 28 numaralı bireyler *Lr19* geni içeren genotipler olarak belirlenmişlerdir.)

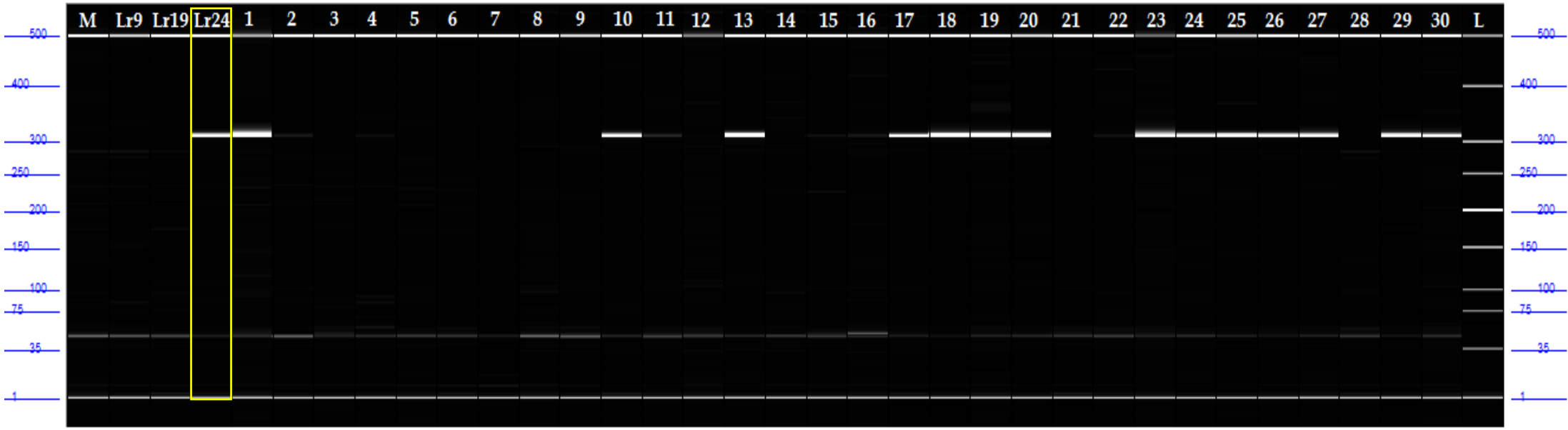
3.2.5. *Lr24* Geni İçin Kullanılan Markır Sonuçları

3.2.5.1. J09-1/J09-2 markırı

J09-1/J09-2 markırı ile ebeveynlerde yapılan PCR sonucunda; *Lr24* dayanıklılık genini içeren Tc*Lr24'de 311 bç büyüklüğünde bir DNA fragmenti elde edilmiştir (Şekil 3.18). Morocco x Tc*Lr19 melez kombinasyonundan elde edilen 30 F_2 bireyinde yapılan taramada bu DNA fragmentinin çoğalttığı bireyler dayanıklı genotipler olarak değerlendirilmiştir. Bu DNA fragmentinin çoğaltılmadığı bireyler ise *Lr24* genini içermeyen genotipler olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.19).



Şekil 3.18. J09-1/ J09-2 markırı ile yapılan PCR sonucunda, *Lr24* geni için ayırıcı olan DNA (311 bç) fragmentinin kapiller elektroforezdeki pik görüntüsü

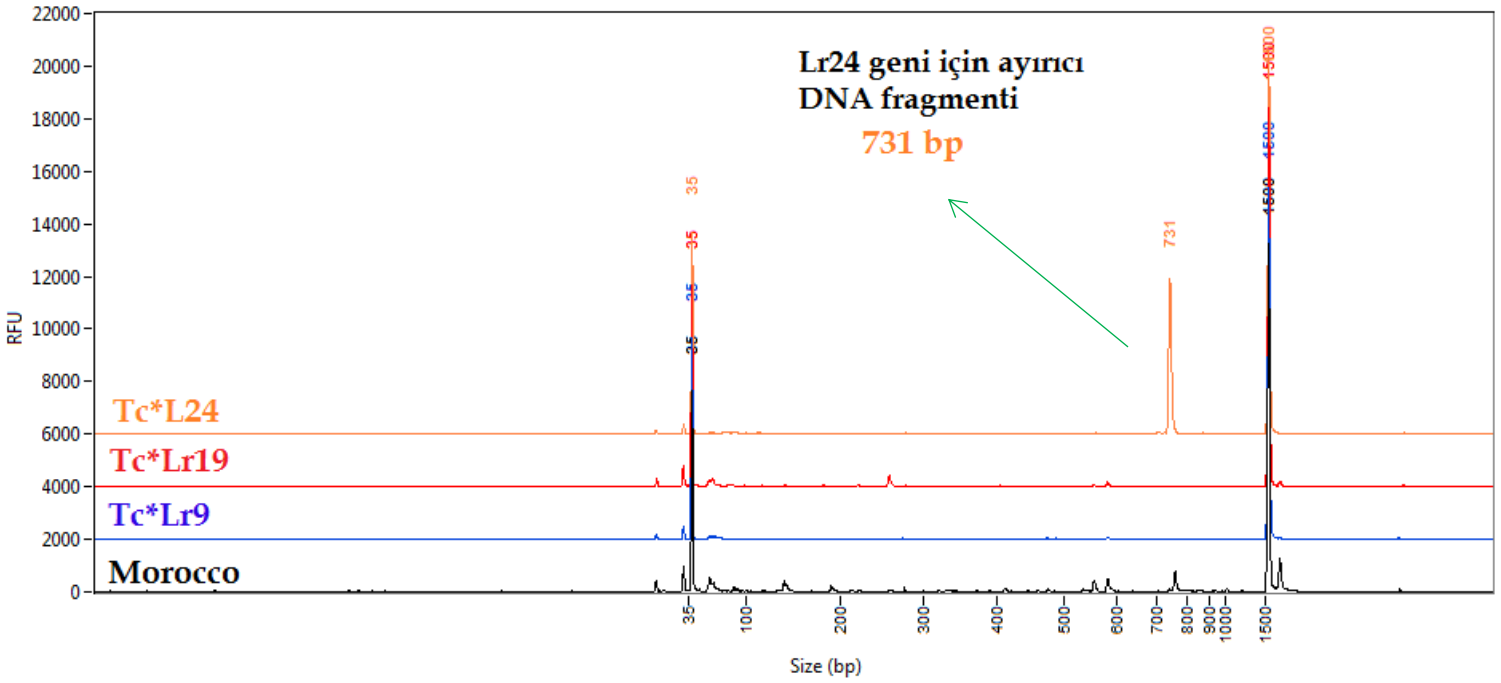


Şekil 3.19. Ebeveynler ve Morocco x Tc*Lr24 melezinden elde edilen F_2 bireylerinde J09-1/J09-2 markırı tarama.

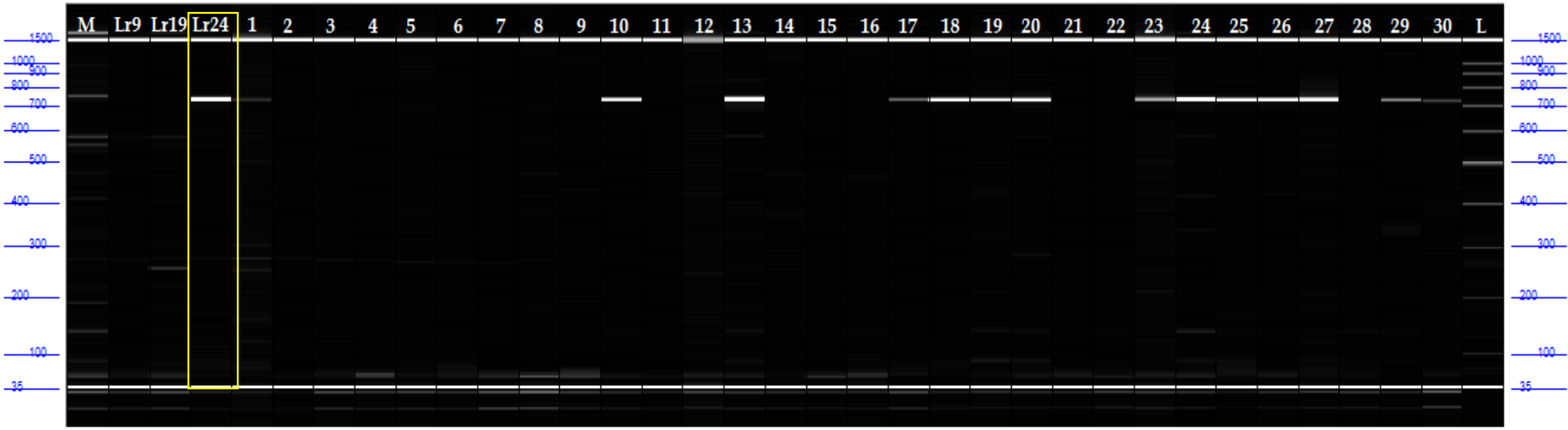
(**M**: Morocco **Lr9:** Tc*Lr9 **Lr19:** Tc*Lr19 **Lr24:** Tc* Lr24 **L:** Ladder. Yukarıda 1-30 arası numaralandırılmış bireyler Morocco x Tc*Lr24 melezinin F_2 bireyleri. Kapiller sonucuna göre 1, 2, 4, 10, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30 numaralı bireyler *Lr24* geni içeren genotipler olarak belirlenmiştir.)

3.2.5.2. SCS73$_{719}$ markırı

SCS73719 markırı ile ebeveynlerde yapılan PCR sonucunda *Lr24* dayanıklılık genini içeren Tc*Lr24'de 731 bç büyüklüğünde bir DNA fragmenti elde edilmiştir (Şekil 3.20). Morocco x Tc*Lr19 melez kombinasyonundan elde edilen 30 F_2 bireyinde yapılan taramada bu DNA fragmentinin çoğalttığı bireyler dayanıklı genotipler olarak değerlendirilmiştir. Bu DNA fragmentinin çoğaltılmadığı bireyler ise *Lr24* genini içermeyen genotipler olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.21).



Şekil 3.20. SCS73$_{719}$ markırı ile yapılan PCR sonucunda, *Lr24* geni için ayırıcı olan DNA (731 bç) fragmentinin kapiller elektroforezdeki pik görüntüsü

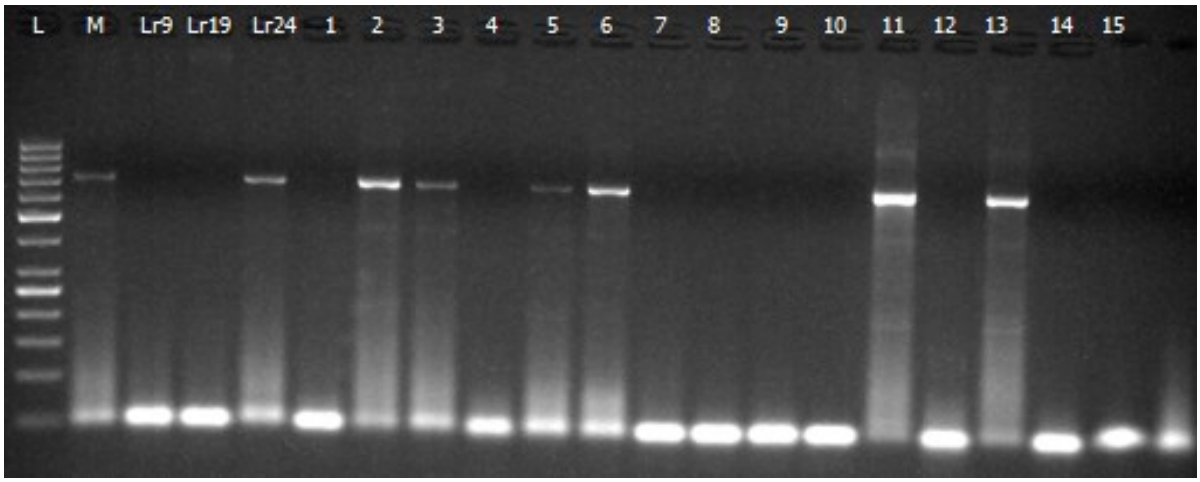


Şekil 3.21. Ebeveynler ve Morocco x Tc*Lr24 melezinden elde edilen F_2 bireylerinde $SCS73_{719}$ markırı tarama

(**M**: Morocco **Lr9:** Tc*Lr9 **Lr19:** Tc*Lr19 **Lr24:** Tc* Lr24 **L:** Ladder. Yukarıda 1-30 arası numaralandırılmış bireyler Morocco x Tc*Lr24 melezinin F_2 bireyleri. Kapiller sonucuna göre 10, 13, 17, 18, 19, 20, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30 numaralı bireyler *Lr24* geni içeren genotipler olarak belirlenmiştir.)

3.2.5.3. H51/H52 markırı

H51/H52 markırı ile yapılan PCR sonucunda elde edilen jel elektroforez analizinde *Lr24* dayanıklılık geninin seleksiyonunda kullanılabilecek spesifik bir DNA fragmentinin olmadığı görülmüştür (Şekil 3.22).



Şekil 3.22. H51/H52 markırı ile yapılan PCR sonucu elde edilen jel görüntüsü (**L:** Ladder, 50 bç GeneRuler, **M:** Morocco, **Lr9:** Tc*Lr9, **Lr19:** Tc*Lr19, **Lr24:** Tc*Lr24, **1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-15:** Morocco x Tc*Lr24 melezinin F_2 bireyleri)

Çizelge 3.7. Tüm markırların Morocco ile Tc*9, Tc*19 ve Tc*24 ebeveynlerinin melezlerinden elde edilen F_2 bireylerinde tarama sonucu. (+: markırda ayırıcı DNA fragmentinin bulunduğu F_2 bireyleridir, boş olan bireylerde beklenen DNA fragmenti gözlemlenmemiştir.)

Birey No	***Lr9, Lr19* ve *Lr24* için Moleküler Markırlarla Seleksiyon**						
	Morocco x Tc*Lr9	**Morocco x Tc*Lr19**				**Morocco x Tc*Lr24**	
	SCS5	**SCS265**	**SCS253**	**Xwm211**	**GbF/GbR**	**J09-1/J09-2**	**$SCS73_{719}$**
1			+			+	
2	+		+			+	
3		+					
4						+	
5	+	+	+		+		
6			+				
7				+	+		
8	+		+				
9		+	+	+	+		
10		+		+		+	+
11	+		+			+	
12	+		+				
13	+		+			+	+
14	+	+	+	+	+		
15		+		+	+	+	
16	+	+	+	+	+	+	
17	+	+		+	+	+	+
18			+	+	+	+	+
19						+	+
20		+	+	+		+	+
21	+		+				
22		+		+	+	+	
23		+	+	+	+	+	+
24		+	+	+		+	+
25	+	+	+	+	+	+	+
26	+			+	+	+	+
27		+		+	+	+	+
28	+	+		+	+		
29	+	+		+		+	+
30		+		+		+	+

BÖLÜM 4

4.1. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Buğday dünyada neredeyse her yerde üretimi yapılan ve insanların temel besin kaynağını sağlayan bitkidir. Artan nüfusun gıda güvenliğini sağlanması amacıyla buğday üretiminin artması ve üretimdeki verim kayıplarının azaltılması önemli konulardandır. Kahverengi pas hastalığı dünya çapında buğday üretiminin verimini ve kalitesini etkileyen en önemli etmenlerden biridir. Verim kayıpları bitki genotipinde bulunan çeşitli kahverengi pas dayanıklılık genlerinin (*Lr* genleri) varlığına göre %5-70 arasında değişiklik göstermektedir (Cherukuri vd., 2003). *Lr9, Lr19*, *Lr25*, *Lr29*, *Lr35*, *Lr28*, *Lr24* genleri halihazırda dünyada dayanıklılık sağlayan *Lr* genleridir, *Lr37* geni de kısmi dayanıklılık sağlamaktadır (Vida vd., 2010). Hastalığa sebep olan patojen yıllar içinde mutasyon geçirerek etkin dayanıklılık sağlayan *Lr* genlerine karşı dayanıklılığı kırabilecek yeni bir ırk oluşturabileceğinden, buğdayda etkin direnç sağlamak için yeni dayanıklılık genleriyle çalışmaların sürdürülmesi gereklidir. Hastalıkla mücadelenin en ekonomik ve sürdürülebilir yolu ıslah çalışmalarıyla dayanıklılık sağlayan *R* genlerini yaygın ekimi yapılan verimli çeşitlere aktarmaktır. Hastalığa dayanıklı çeşitlerin seleksiyonunda moleküler markırların kullanımı hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Hastalığa dayanıklılık sağlayan *Lr* genleriyle bağlantılı moleküler markır çalışmaları tüm dünyada yapılmaktadır. Bu tez çalışması ile Trakya Bölgesi'nde kahverengi pasa dayanıklılık sağlayan *Lr9*, *Lr19* ve *Lr24* genlerinin ayırt edici markırları test edilmiş ve ıslahta rutin olarak seleksiyonda kullanılmak üzere optimize edilmiştir

Nocente vd. 2007'de yaptıkları bir çalışmada hassas olan yaygın buğday çeşitleri Bolero, Colfiorito, Serio ve Spada'yı kullanarak melezleme yapmışlar ve F_2 bireylerinin seleksiyonunda STS, SCAR ve CAPS markırları kullanmışlardır. Bu markırlar ile F_2 genotiplerinde *Lr1*, *Lr9*, *Lr24* ve *Lr47* genlerinin markır destekli seleksiyonunu

yapmışlardır. Serio x Tc*Lr9 melezlerinin F_2 bireylerinde J13 STS markırını kullanarak yaptıkları taramada 1100 bç'de *Lr9* geni için ayırt edici DNA fragmentini gözlemlemiş ve bu fragmentin seleksiyon yaptığını raporlamışlardır. Aynı çalışmada Bolero x Tc*Lr24 melezlerinin F_2 bireylerinde H51/H52 STS markırını kullanarak yaptıkları taramada 700 bç'de *Lr24* geni için ayırt edici DNA fragmentini gözlemlemiş ve seleksiyon yaptığını raporlamışlardır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlarda J13 ve H51/H52 markırları Nocente vd. yaptığı çalışmadaki sonuçlara uyumlu ayırt edici DNA fragmentleri elde edilememiştir. J13 markırının optimizasyon sorununun olduğu düşünülmesine rağmen, H51/H52 markırı ile Tc*Lr24 hattında 700 bç civarında ayırıcı DNA fragmenti gözlemlenmiştir fakat hiçbir dayanıklılık geni içermeyen Morocco çeşitinde de aynı DNA fragmentinin elde edilmesinden dolayı selektif bir markır olmadığı sonucuna varılmıştır. Gelecek yıl seçilen bireylerden elde edilecek F_3 kademesindeki genotiplerde aynı markırla seleksiyon yapılacak ve hastalık testleri ile doğrulama gerçekleştirilecektir.

Gupta vd., 2006'da yaptıkları bir çalışmada *Lr19* geniyle bağlantılı markır çalışmaları yapmışlardır. Xwmc221 SSR markırı ile yaptıkları taramada *Lr19* genini içeren bireylerde 200 bç büyüklüğünde ayırt edici bir DNA fragmenti görülmüştür. SCS265 ve SCS253 SCAR markırlarıyla yaptıkları taramalarda ise sırasıyla *Lr19* genini içeren bireylerde 512 bç ve *Lr19* genini içermeyen bireylerde ise 736 bç'de ayırt edici DNA fragmenti gördüklerini raporlamışlardır. Bu tez çalışmasında Xwmc221, SCS265 ve SCS253 markırları ile yapılan tarama da Gupta vd.'in elde ettikleri sonuçlarla aynı sonuçlar bulunmuştur. Xwmc221 markırı ile yapılan taramada 193 bç'de, SCS265 markırı ile yapılan taramada 511 bç'de, SCS253 markırı ile yapılan taramada ise 770 bç'de ayırıcı DNA fragmentleri gözlemlenmiştir. Bu markırların *Lr19* geni için selektif olduğu sonucuna varılmıştır. SCS253 markırının negatif seleksiyon yaptığı ve bu markırın heterezigot genotiplerin ayrımında kolaylıkla kullanılabileceğini söyleyebiliriz. Gelecek yıl seçilen bireylerden elde edilecek F_3 kademesindeki genotiplerde aynı markırla seleksiyon yapılacak ve hastalık testleri ile doğrulama gerçekleştirilecektir.

Dhillon & Dhaliwal, 2011'de yaptıkları çalışmada birçok RAPD markırı kullanmış bunlar içinden OPA19 ve OPD12 markırlarının *Lr9* geniyle bağlantılı olduklarını raporlamışlardır. Sunulan tez çalışmasında ise OPD12 ve OPA19 markırlarıyla yapılan taramalarda *Lr9* geni için selektif bir DNA fragmenti gözlemlenmemiştir. RAPD markırlarının hızlı ve kolay sonuç vermesinin yanı sıra tekrarlanabilirliklerinin düşük

olması sonuçlarının çok stabil olmamasına ve PCR koşullarındaki ufak değişikliklerin bile sonuçları etkilemesine olanak vermektedir. O nedenle bu tez çalışmasında elde edilen sonuçların yayınlanan sonuçlarla örtüşmemesi RAPD markırlarının doğasından kaynaklanan karşılaşılabilen bir durum olarak yorumlanmıştır.

Blaszczyk vd. 2004'de yaptıkları çalışmada GbF/GbR markırı ile 130 bç'de *Lr19* geni için ayırt edici DNA fragmenti gözlemlemişlerdir. Sunulan tez çalışmasında Blaszczyk vd. ile aynı sonuçlar elde edilmiş, 135 bç büyüklüğündeki DNA fragmentinin *Lr19* geni için ayırt edici olduğu ve ıslah çalışmalarında MAS amaçlı kullanılabileceği öngörülmüştür. Aynı çalışmada J09-1/J09-2 markırıyla yapılan tarama sonucunda 310 bç'de *Lr24* geni için ayırt edici DNA fragmenti gözlemlediklerini raporlamışlardır. Tez çalışmasında bu markır için de paralel sonuçlar elde edilmiş olup 311 bç'de *Lr24* geni için selektif bir DNA fragmenti gözlemlenmiştir. Elde edilen seçici markırın seleksiyon etkinliği gelecek yıl seçilen bireylerden elde edilecek F_3 kademesindeki genotiplerde markır ve hastalık testleri ile tekrar değerlendirilerek doğrulanacaktır.

Cherukuri vd. 2003'de yaptıkları bir çalışmada *Lr19* geni için RAPD ve SCAR markırlar kullanarak MAS yapmışlardır. Yaptıkları çalışma sonucunda $SCS73_{719}$ markırının *Lr19* genini içeren bireylerde 719 bç büyüklüğünde ayırt edici bir DNA fragmenti gözlemlemişlerdir. Gupta vd. 2005'de yaptıkları çalışmada ise F_2 bireylerinde yaptıkları tarama sonucunda $SCS73_{719}$ markırının *Lr24* geni için ayırıcı olduğunu tekrar raporlamışlardır. Sunulan tez çalışmasında ise *Lr19* geni için ayırıcı olduğu yayınlanan $SCS73_{719}$ markırı farklı olarak *Lr24* geni için ayırt edici 731 bç büyüklüğünde bir DNA fragmenti üretmiştir. Yapılan literatür taraması sonucunda bazı farklı kaynaklarda da bu markırın *Lr24* geni için ayırt edici olduğu belirtilmiştir (Vida vd., 2010). Cherukuri vd. yaptıkları çalışmada bitki materyallerinin karışmış olma ihtimali düşünülmektedir. Çünkü *Lr19* geni kromozomun 7DL lokasyonunda yer alırken *Lr24* geni kromozomun 3DL lokasyonunda bulunmaktadır. Sonuç olarak $SCS73_{719}$ markırı bizim çalışmamızda *Lr24* geni için ayırt edici bulunması bazı diğer araştırıcıların yayınları (Gupta vd., 2005) ile de doğrulanmıştır.

Moullet vd. 2009'da yaptıkları bir çalışmada gen piramitleme yapmak için MAS kullanarak *Lr9* ve *Lr24* genlerinin seleksiyonunu yapmışlardır. *Lr9* geni taşıyan bireylerin seleksiyonu için SCS5 ve J13 markırlarını, *Lr24* geni taşıyan bireylerin seleksiyonu için

ise J09-1/J09-2 ve H51/H52 markırlarını kullanmış ve olumlu sonuçlar almışlardır. Gupta vd. 2005'de yaptıkları çalışmada da yine SCS5 markırının 520 bç civarında çoğalttığı DNA fragmenti sayesinde *Lr9* geni için selektif olduğunu raporlamışlardır. Bu çalışmada SCS5 markırı kullanılarak yapılan taramada *Lr9* geni için 548 bç'de ayırt edici DNA fragmenti çoğalttığı gözlemlenmiştir. SCS5 markırı diğer markırlar için kullandığımız PCR koşullarında çalışmamıştır, birkaç optimizasyon çalışmasından sonra ticari PCR Master Mix kullanılarak gerçekleştirilen PCR'dan olumlu sonuçlar alınmıştır. Sonuç olarak SCS5 markırının *Lr9* geni için selektif olduğu gözlemlenmiştir.

Morocco x Tc*Lr9 ve Morocco x Tc*Lr24 melezlerinin F_2 bireylerinde *Lr19* ve *L24* genleri için yapılan markırlarla seleksiyonda bazı örnekler için iki markır sonuçlarının farklı sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir (Çizelge 3.7). Bu durumun bazı bireylerde, markır ile gen bölgesi arasında gerçekleşen bir rekombinasyondan kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle bir *Lr* geni için birden fazla markırla seleksiyonu bu yanılgıları minimuma indirecektir. Dolayısıyla her gen için birden fazla seçici markırın belirlenmiş olması son derece önemlidir ve bir gen için tüm markırların pozitif sonuç verdiği F_2 bireylerinin bu geni içerme oranı %100'e yakın olacaktır.

Yapılan çalışmalar sonucunda ıslah çalışmalarında kullanılmak üzere *Lr9* geni için ayırıcı bir markır, *Lr19* geni için ayırıcı dört markır ve *Lr24* geni için ayırıcı iki markır tespit edilmiştir. Çalışmanın gelecekteki amacı bu ayırıcı markırların kullanılarak dayanıklılık genlerinin farklı kombinasyonlarda (*Lr9* + *Lr19*, *Lr19* + *Lr24*, *Lr9* + *Lr24*) ve üç dayanıklılık genini (*Lr9* + *Lr19* + *Lr24*) bir genotipte toplayarak uzun süre dayanıklılığın sağlanmasıdır. Çalışmanın amacı bu farklı gen kombinasyonlarını bölgemizde yaygın ekimi yapılan ancak hassas olan buğday çeşidinde piramitlemek ve Trakya Bölgesi'nde kahverengi pasa dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi amacıyla yapılacak ıslah programlarında MAS'ın aktif biçimde kullanımını hayata geçirmektir.

KAYNAKLAR

Akan, K., Yazar, S. (2013). Orta Asya ve Kafkasya Bölgesinde Tahıl Hastalıklarının, Zararlıların ve Yabancı Otların İzlenmesi ve Tahıllarda Dayanıklılık Islahı Uzmanlarının Bölgesel Düzeyde Bilgi Alışverişi. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (TARM). Kazakistan Almaata.

Akın, B. (2007). Bazı Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) Çeşit ve Islah Hatlarının Kahverengi Pasa (*Puccinia recondita f.sp. tritici*) Dayanıklılık Genleri Üzerine Araştırmalar. Ege Üniversitesi/Fen Bilmleri Enstitüsü, İzmir.

Allen, R.F. (1926). A Cytological Study Of Puccinia Triticina Pyhsiologic Form 11 On Little Club Wheat. *Journal Of Agricultural Research* (33)1.

Aybeke, M. (2015). Screening of *Lr* Genes Providing Resistance to Leaf Rust in Wheat Using Multiplex PCR Method. *Trakya Universty Journal of Natural Sciences*, 16(1):45-49.

Aykut, F. (2007). *Buğdayda Kahverengi Pasa Dayanıklılık Genleri İle İlgili Moleküler Markörler Üzerinde Araştırmalar*. Ege Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Bertrand, C., Collard Y. & Mackill D.J. (2008). Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Phil. Trans. R. Soc.B*., 363, 557–572.

Blaszczyk, L., Chelkowski, J., Korzun, V., Kraic, J., Ordon, F., Ovesna, J., Purnhauser, L., Tar, M. & Vida, G. (2004). Verification of STS Markers For Leaf Rust Resistance Genes Of Wheat By Seven European Laboratories. *Cellular & Molecular Biology Letters* (9):805-817.

Bockus, W.W., Bowden, R.L., Hunger, R.M., Morrill, W.L., Murray, T.D. & Smiley, R.W. (2010). *Compendium of Wheat Diseases and Pests* (3.baskı). USA: Minnesota.

Bolton, M.D., Kolmer, J.A. & Garvin, D.F. (2008). Wheat leaf rust caused by Puccinia triticina. *Molecular Plant Pathology*, 9(5), 563-575.

Chelkowski, J. & Stepien, L. 2001. Molecular markers for leaf rust resistance genes in wheat. *J.AppI.Genet*, 42(2):117-126.

Cherukuri, D.P., Gupta, S.K., Charpe, A., Koul, S., Prabhu, K.V., Singh R.B., Haq, Q.M.R. & Chauhan, S.V.S. (2003). Identification of a molekular marker linked to an *Agropyron elongatum*-derived gene *Lr19* for leaf rust resistance in wheat. *Plant Breeding* 122, 204-208.

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. Russian Journal of Genetics; Applied Research 5(3):227-232.

Devran, Z. (2003). Moleküler İşaretleyicilerin Dayanıklılık Islahında Kullanılması. *Derim*, 20:1-6.

Dhillon, N.K. & Dhaliwal, H.S. 2011. Identification of Molecular Markers Linked to Leaf Rust Resistance Genes in Wheat and Their Detection in the Local Near-Isogenic Line. American Journal of Plant Sciences,433-437.

Gupta, S., Charpe, A., Koul, S., Prabhu, V., Mohd, Q. & Haq, R. (2005). Development and validation of molecular markers linked to an *Aegilops umbellulata*-derived leaf rust resistance gene, *Lr9*, for marker-assited selection in bread wheat. *Genome* 48, 823-830.

Gupta, S.K., Charpe, A., Koul, S., Prabhu, K.V. & Haq, Q.M.R. (2005). Development and validation of molecular markers linked to an Aegilops umbellulata-derived leaf-rust-resistance gene, Lr9, for marker-assisted selection in bread wheat. *Genome* 48:823-830.

Gupta, S.K., Charpe, A., Prahbu, K.V. & Haque, Q.M.R. (2006a). Identification and validation of molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr19* in wheat. Theoretical and Applied Genetics. DOI 10.1007/s00122-006-0362-7.

Gupta, S.K., Charpe, A., Soul, S., Haque, Q.M.R. & Prabhu, K.V. (2006b). Development and validation of SCAR markers co-segregating with an *Agropyron elongatum* derived leaf rust resistance gene *Lr24* in wheat. Euphytica. DOI:10.1007/s10681-006-9113-8.

Güleç, T.E., Yıldırım, A. & Sönmezoğlu, Ö.A. (2010). Bitkilerde Markör Destekli Seleksiyon. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 3(2). 67-79.

Hammond-Kosack, K.E. & Jones, J.D.G. (1997). Plant Disease Resistance Genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 48:575-607.

Hasancebi S., Mert Z., Ertugrul F., Akan K., Aydin Y., Senturk Akfirat F. & Altinkut Uncuoglu A. (2014). An EST-SSR marker, *bu099658*, and its potential use in breeding for yellow rust resistance in wheat. *Czech J. Genet. Plant Breed*, **50**: 11–18

Hasançebi, S. (2013). *Buğdayda Sarı Pas Hastalığı Dayanıklılık Mekanizmasının Yeni Nesil İki-Boyutlu Sıvı Kromatografisi Sistemi Kullanılarak Proteom Düzeyinde İncelenmesi*. TÜBİTAK MAM/ Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü/Kocaeli.

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.

Kolmer, J.A. (1996). Genetics of resistance to wheat leaf rust. *Annu. Rev. Phytopathol*. 34:435-55.

Kolmer, J.A., Mert Z., Akan K., Demir L., Ünsal R., Şermet C., Keser M., Akin B. & Morgounov A. (2012). Virulence of Puccinia triticina in Turkey and leaf rust resistance in Turkish wheat cultivars. *Eur J Plant Pathol* doi:10.1007/s10658-012-0107-1.

Liu, S., Rudd, J.C., Bai, G., Haley, S.D., Ibrahim, A.M.H., Xue, Q., Hays, D.B., Graybosch, R.A., Devkota, R.N. & Amand, P.S. (2014). Molecular Markers Linked to Genes Important for Hard Winter Wheat Production and Marketing in the U.S. Great Plains. *Crop Science*, doi:10.2135/cropsci2013.08.0564.

Marsalis, M.A. & Goldberg, N.P. (2016). Leaf, Stem and Stripe Rust Diseases of Wheat. *Consumer and Environmental Sciences*, New Mexico State Universtiy.

Mert, Z., Karakaya, A., Akan, K., Çetin, L. & Düşünceli, F. (2012). Bazı Buğday Genotiplerinin Kara Pas Hastalığının Farklı Irklarına Karşı Reaksiyonların Belirlenmesi. *Bitki Koruma Bülteni*, 52(3):207-221.

Mızrak, G. (2011). *Buğdayın Hikayesi*. Türkiye Ziraat Odaları Birliği. Ankara.

Moullet, O., Fossati, D., Mascher, F., Guadagnolo, R. & Schori, A. (2009). Use of marker-assisted selection (MAS) for pyramiding two leaf rust resistance genes (*Lr9* and *Lr24*) in wheat. University of Neuchâtel, Evolutionary botany laboratory, Institute of biology, rue Emile Argand 11, Neuchâtel, Switzerland.

Nocente, F., Gazza, L. & Pasquini, M. (2007). Evaluation of leaf rust resistance genes Lr1, Lr9, Lr24, Lr47 and their introgression into common wheat cultivars by marker-assisted selection. *Euphytica* doi:10.1007/s10681-006-9334-x,155:329-336.

Olson, M., Hood, L., Cantor, C. & Botstein D. (1989). A common language for pyhsical mapping of the human genome. *Science*,29;245(4925):1434-5.

Özberk, İ., Atay, S., Altay, F., Cabi, E., Özkan, H. & Atlı, A. (2016). *Türkiye'nin Buğday Atlası*. http://www.wwf.org.tr/?6140 .

Paran, I. & Michelmore, R.W. 1992. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor AppI Genet*,85:985-993.

Plantscience. (2017). http://plantsciences.montana.edu/facultyorstaff/faculty/huang/Rust%20Inoculation%20Protocols.pdf

Prescott, J.M., Burnett, P.A., Saari, E.E., Ransom, J., Bowman, J., Milliano, W.de., Singh, R.P. & Bekele, G. (1986). *Wheat Diseases and Pests: A Guide for Field Identification*. CIMMYT. Mexico, D.F.

Semagn, K., Bjørnstad, A. & Ndjiondjop, M.N. (2006). An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*,5(25) pp.2540-2568.

Sorrells, M.E. & Wilson, W.A. (1997). Direct Classification and Selection of Superior Alleles for Crop Improvement. *Crop Science*, 37:691-697.

Sönmezoğlu, Ö.A., Yıldırım, A., Güleç, T.E., Kandemir, N. (2010). Markör Destekli Seleksiyonun Buğday Islahında Kullanımı. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 27(1). 105-112.

TAGEM, http://www.tarim.gov.tr/TAGEM/Belgeler/pdgt/bsad/bsad_ozetler.pdf

Tör, M. (1996). Bitkilerde Moleküler Konukçu-Patojen İlişkilerindeki Son Gelişmeler. *Tr. J. Of Biology* 22. 271-285.

Vida G., Gal M., Uhrin, A., Veisz O., Wang Z., Kiss T., Karsai I. & Bedo, Z. (2010). Application of molecular markers in breeding for leaf rust resistance in wheat. 60. Tagung der Vereinigung der Pfl anzenzüchter und Saatgutkaufl eute Österreichs 2009, 65-71.

Zhanga, W., Chena, S., Abate, Z., Nirmala, J., Rouse, M.N. & Dubcovsky, J. (2017). Identıfication and characterization of Sr13, a tetraploid wheat gene that confers resistance to the Ug99 stem rust race group. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.(114) 45:E9483-E9492.

ÖZGEÇMİŞ

Gül Çiçek KILIÇ 1993 yılında İstanbul Fatih'de doğdu. İlköğretim, ortaöğretim ve lise eğitimini İstanbulda tamamladı. 2015 yılında Gaziosmanpaşa Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Biyomühendislik bölümünden TÜBİTAK 2209-A Üniversite Öğrencileri Yurt İçi Araştırma Projeleri ve Destek P.'nın desteğiyle lisans tezini tamamlayıp mezun oldu. 2015 yılında Trakya Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.

TEZ ÖĞRENCİSİNE AİT TEZ İLE İLGİLİ BİLİMSEL FAALİYETLER

Tez çalışması kapsamında Trakya Üniversitesi tarafından 15-16 Mayıs 2017 tarihleri arasında Edirne'de düzenlenmiş olan "Trakya Üniversiteler Birliği II. Lisansüstü Öğrenci Kongresi" ne sözlü bildirim ile katılmıştır.

Prof. Dr. Yalçın KAYA tarafından 15-20 Ekim 2017 tarihleri arasında Girne/Kıbrıs' da düzenlenmiş olan "III. Uluslararası Bitki Islahı Kongresi"nde poster sunumu yapmıştır.