

Bazı Ekmeklik Buğday Genotiplerinde SSR (Mikrosatalit) Markörü Kullanılarak Kahverengi Pas Dayanıklılık Geni *Lr10*'un Belirlenmesi

Pakize Özlem KURT POLAT¹, Köksal YAĞDI²

¹Bursa Uludağ Üniversitesi, Orhangazi Yeniköy Asil Çelik Meslek Yüksek Okulu, Bursa, ²Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Bursa

¹<https://orcid.org/0000-0002-1818-7243>, ²<https://orcid.org/0000-0003-1567-9397>

✉: ozlemkurt@uludag.edu.tr

ÖZET

Çalışmada, Türkiye’de ekmeklik buğday tarımında sıklıkla tercih edilen çeşitler, CIMMYT-Meksika’dan temin edilen Thatcher hatlar ve bu genotipler arasında yapılan melezlemeler sonucu elde edilen F₁ melez genomlarında, SSR (Basit Dizi Tekrarları-Mikrosatelit) yöntemi kullanılarak, kahverengi pas hastalığına dayanıklılık genleri arasında önemli bir yere sahip olan *Lr10* geninin varlığını incelenmiştir. Araştırma yer alan genotipler, 2013-2017 yetiştirme dönemlerinde; deneme materyalinin çoğaltılması, genotipler arası melezlemelerin gerçekleştirilmesi ve kahverengi pas hastalığının arazi gözlemlerinin yapılması amacıyla Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi deneme alanında yetiştirilmiştir. Yapılan melezlemeler sonucu elde edilen 13 adet F₁ hattı, 22 adet ekmeklik (*Triticum aestivum* L.) buğday çeşidi ile 2 adet Thatcher hat (*Lr10*, *TcHassas*), Bursa Uludağ Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü Tohumluk Laboratuvarında SSR (mikrosatlit) yöntemi kullanılarak DNA analizlerine tabi tutulmuştur. Yapılan analizler sonucunda *Lr10* geni; Karatopak, Kaşifbey ve Gün-91 çeşitlerinde tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışma; ekmeklik buğdayda SSR tekniğinin kahverengi pas dayanıklılık genlerini belirlemede kullanılabilir olduğunu saptamış ve ayrıca çalışmada yer alan Thatcher (yakın izogenik) hatlarının dar bir genetik yapıya sahip olmaları sebebiyle, taranan dayanıklılık genlerini belirlemede iyi bir belirteç genom olduğu sonucunda varılmıştır. Gelecekte yürütülecek ıslah programlarında dayanıklılık genleri içeren genotiplerin belirlenmesinde moleküler markörlerin kullanılmasının kısa sürede ve kesin sonuçlara ulaşmada etkili olacağı sonucuna ulaşılmıştır.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihiçesi

Geliş Tarihi : 15.05.2020

Kabul Tarihi : 27.10.2020

Anahtar Kelimeler

Ekmeklik buğday
SSR (Mikrosatalit)
Lr10
Moleküler Markör

Identifying Leaf Rust Resistance Gene *Lr10* in Some Bread Wheat Using Simple Sequence Repeat (SSR) Marker

ABSTRACT

In this study, the existence of the *Lr10* gene, which has an important place among the leaf rust disease genes, was investigated by using the SSR (Simple Sequence Repeats-Microsatellite) method in frequently used F₁ hybrid genomes bread wheat that bred from Thatcher lines of CIMMYT Mexico. In order to reproduce the trial plant material, to perform cross-genotypes and to make field observations of leaf rust disease, 13 F₁ lines, 22 bread (*Triticum aestivum* L.) wheat varieties and 2 Thatcher lines (*Lr10*, *Tc* susceptible) a study was conducted at the experiment fields of Bursa Uludağ University Faculty of Agriculture, Agricultural Application and Research Center between 2013-2017. genotypes were subjected to DNA analysis using the SSR (microsatite) method in the Seed Laboratory of the Field Crops Department of the Bursa Uludağ University Faculty of Agriculture. The analysis results indicated the existence of the *Lr10* gene in Karatopak, Kaşifbey and Gün-91 varieties. In this study; The SSR technique was found to be useful for determining leaf rust resistance genes in bread wheat, and it was

Research Article

Article History

Received : 15.05.2020

Accepted : 27.10.2020

Keywords

Bread wheat
SSR (Microsatellite)
Lr10
Molecular Marker

also concluded that the Thatcher (close isogenic) lines in the study had a narrow genetic structure, so it was considered a good marker genome to determine the screened resistance genes. It has been concluded that the use of molecular markers in determining genotypes containing resistance genes in breeding programs will be effective in the future.

Atf İçin: Kurt Polat P Ö, Yağdı K 2021. Bazı Ekmeklik Buğday Genotiplerinde SSR (Mikrosatelit) Markörü Kullanılarak Kahverengi Pas Dayanıklılık Geni *Lr10*un Belirlenmesi. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 24 (4): 850-858. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.738143.

To Cite : Kurt Polat P O, Yagdi K 2021. Identifying Leaf Rust Resistance Gene *Lr10* in Some Bread Wheat Using Simple Sequence Repeat (SSR) Marker. KSU J. Agric Nat. 24 (4): 850-858. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.738143.

GİRİŞ

Buğday, dünyada ekiliş ve üretim bakımından ilk sırada yer alan, insan ve hayvan beslenmesi için önemli bir kültür bitkisidir (Yağdı 2002). Buğday bitkisi çok farklı çeşitleri ihtiva etmesi, geniş adaptasyon yeteneği ve kullanım alanlarının çokluğu sebebiyle ekvator dan kutuplara, alçak ovalardan yüksek yaylalara kadar geniş alanlara yayılabilmiştir. Yüksek nem, verimli toprak isteyen buğday çeşitlerinin yanında, verimliliği düşük topraklarda yetişebilen buğday çeşitleri de vardır. Dünya genelinde besinlerden alınan kaloringin %20'sini sağlayan ve nüfusun % 35'inin temel besini olan buğday, Türkiye için de stratejik ürünlerden birisidir (FAO 2018)

FAO 2018 yılı verilerine göre buğday, Dünya'da 214 milyon ha ekim alanına, 734 milyon ton üretime sahipken, Türkiye'de 7,2 milyon ha ekim alanına, 20 milyon ton üretime sahiptir (FAO 2018). Dünya'da buğday ekiliş alanı olarak Hindistan, üretim miktarı olarak ise Avrupa Birliği ilk sırayı almaktadır. Türkiye ise %3'lük üretim miktarı ile dünya genelinde 9. sırada yer almaktadır.

Türkiye için önemli bir kültür bitkisi olan buğdayın son yıllarda ekim alanlarında azalma gözlemlenmektedir (FAO 2019). Buna karşın nüfus her geçen gün artmakta ve buğdayın kullanım alanları, ihtiyaç miktarı da nüfus artışına paralel olarak artmaktadır. Ekim alanları azalırken talebin artışında ki ters orantının dengelenmesi için verimin artırılması tek çaredir. Sadece verim artışının günümüz buğday tüketim koşullarında yetersiz olduğu bilinmektedir. Verim artışının yanı sıra, biyotik ve abiyotik stres koşullarına dayanıklı, üstün kalite özelliklerine sahip çeşitlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Bitkisel üretimde; gübreleme, sulama, zirai ilaç kullanımını ve bakım işlemleri önemli verim artışları sağlamış olmakla beraber bu denli yoğun tarımsal faaliyetler çevre üzerinde ve ekim alanlarında olumsuz etkiler yaratmıştır ve belirli bir noktadan sonra istenilen verim değerlerine ulaşamamıştır. Bu sebeple ıslah yöntemleri her geçen gün önem kazanmaktadır. Klasik ıslah yöntemleri ve mevcut

tarım alanları üzerinde kullanılan tarımsal tekniklerle önümüzdeki 20 yıl içerisinde artacak dünya nüfusuna yetecek gıda maddeleri üretimi mümkün görülmemektedir. Bu sebeple moleküler ıslah yöntemleri, hastalık ve zararlılara; kuraklık ve tuzluluk gibi çevre koşullarına dayanıklı, bitki besin maddeleri içeriği iyileştirilmiş yüksek kaliteli ve verimli yeni çeşitlerin geliştirilmesi için bitki ıslahçılarında büyük kolaylıklar sağlayacak yeni yöntemler olarak uygulamaya alınmıştır (Çetiner 2015).

Buğday üretimini önemli ölçüde sınırlandıran biyotik stres faktörlerinin başında tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de pas hastalıkları gelmektedir. Epidemiyollarında hassas çeşitler üzerinde meydana gelen erken enfeksiyonlar sonucu ürün kayıpları, % 90'lara kadar çıkabilmekte (Aktaş 2001) ve çeşitlerin tamamen üretimden kaldırılmasına neden olabilmektedir. Türkiye'de bugüne kadar buğday bitkisinde farklı pas türlerinin oluşturduğu ortalama kayıpların tane veriminde 53,1 kg/da (% 9,4), 1000 tane ağırlığında ise 4,3 g (% 9,3) olduğu belirlenmiştir (Arslan ve ark. 2002). Kahverengi pas genellikle yapraklarda oluşturduğu püstüller ile fotosentez alanını kısıtlamaktadır. Ürün kaybı, başaktaki tane sayısının azalmasına, tane boyutunun küçülmesine, 1000 tane ve hektolitreye ağırlığının azalması şeklinde olmakta, protein içeriğinin azalması ile de kalite kaybı oluşmaktadır (Arslan ve ark. 2002).

Zirai Mücadele Teknik Talimatların da hastalıkla mücadele yöntemleri açıkça belirtilmekle birlikte etkili yöntem dayanıklı buğday çeşitlerinin belirlenerek veya geliştirilerek kullanılmasıdır.

Buğdayda kahverengi pas hastalığına karşı dayanıklı çeşitler geliştirmek için yapılan ıslah çalışmalarında, klasik ıslah yöntemleri kullanılarak farklı dayanıklılık genlerine sahip çeşitler melezlenip dayanıklılık genleri tek bir çeşitte toplanmaya çalışılmıştır. Son yıllarda ise DNA çalışmaları önemli hale gelmiştir ve moleküler markörlerin geliştirilerek markör destekli seleksiyon çalışmaları hız kazanmıştır bu sayede tahıllarda da verim, kalite ile hastalık ve zararlılara dayanıklılık gibi konularda yapılan çalışmalar artarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Markör destekli seleksiyon (MAS) ile ıslah

çalışmaları daha kısa sürede ve daha az işgücü ile tamamlanabilmekte ve bunların yanı sıra gereksinim duyulan popülasyon büyüklüğü de klasik ıslaha nazaran çok daha küçük olmaktadır (Gupta ve Varshney 2000, Babu ve ark. 2004).

Buğday genomunda bulunan çok sayıdaki hastalık ve zararlılara dayanıklılık özellikleri büyük genler tarafından kontrol edildiği, genomunun büyük ve kompleks bir yapıya sahip olması, ploidi düzeyi ve polimorfizm seviyesinin düşük olması sebebiyle yürütülen moleküler genetik çalışmaları diğer bitkilere kıyasla daha fazla zaman almaktadır (Hoisington ve ark. 1999). Markör destekli seleksiyon (MAS), bu sorunlara çözüm getirmek amacıyla geliştirilen bir yaklaşımdır (Francia ve ark. 2004). MAS yöntemi kullanılarak yabancı ve kültüre alınmış buğday çeşitlerinde kahverengi pas hastalığına dayanıklı gen tespit etme çalışmaları sonucunda günümüzde 80'e yakın kahverengi pasa dayanıklılık geni (Lr) tespit edilmiştir (Davoyan ve ark. 2014). Zaman içinde yapılan çalışmalar sonucunda görülmüştür ki, tek bir dayanıklılık (Lr) genine sahip çeşitlerin kahverengi pas hastalığına karşı gösterdiği dayanıklılık ilaçlamalar sonucu kazandırılan dayanıklılıktan daha fazla olmuştur (Watson ve Singh 1952, Messmer ve ark. 2000). Bu nedenlerle DNA markörleri ıslah çalışmalarında bitki materyallerinin seleksiyonu için en iyi araç olarak görülmektedir (Ovesna ve ark. 2002, Eserkaya 2010).

Kahverengi pas dayanıklılık genlerinin belirlenmesinde SSR ve diğer DNA markörleri başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. SSR markörleri haritalamada, çeşitlerin belirlenmesinde, germplazm muhafazasında, melezlerin belirlenmesinde, gen havuzu varyasyonu analizlerinde ve de ekonomik öneme sahip özellikler için belirleyici markörler olarak kullanılmaktadır. İşlevselliğinin yüksek olmasının yanı sıra, her bir gen tespiti için spesifik primerlere ihtiyaç duyulması, mikrosatelitleri ilk aşamadan itibaren belirlemenin ve geliştirmenin pahalı ve zaman alıcı olması SSR yönteminin zorlayıcı kısmını oluşturmaktadır (Jones ve ark. 1997).

Yürütülen bu çalışmada; yurdumuzda yoğun olarak tarımı yapılan ekmeklik buğday çeşitlerinde, kahverengi pas hastalığına dayanıklılık sağlayan *Lr10* geninin basit dizi tekrarları (SSRs) markörü ile incelemeye alınarak genotiplerdeki varlığı araştırılmıştır. Ayrıca dayanıklı-duyarlı genotipler arasında yapılan melezlemeler ile de dayanıklılık genlerinin aktarımı yönünden incelemeler de bulunulmuştur.

MATERYAL ve METOD

Bitki Materyali

Çalışmada Türkiyede bulunan farklı Tarımsal

Araştırma Enstitüleri ile Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nden temin edilen 22 adet ekmeklik buğday çeşidi ve 2 adet kahverengi pas hastalığı geni bakımından genotipi bilinen CIMMYT-Meksika'dan sağlanan izogenik hatlar (Thatcher hat-Lr10, TcHassas) ve bu genotipler arasında gerçekleştirilen melezlemeler sonucunda elde edilen 13 adet F1 melezi ile beraber toplamda 37 genotip kullanılmıştır. Çalışmada yer alan genotipler ; Thatcher Line-Lr10 (Pozitif Kontrol), TcHassas, Bayraktar, Bezostaja, Cumhuriyet, Golia, Bandırma-97, Karatopak, Gönen-98, Köse 093/39, Pehlivan, Kaşifbey, Aldane, Gün91, Tahirova-2000, Flamura-85, Ceyhan-99, İkizce, İzmir-85, Atilla-12, Gerek79, Karacabey-97, Köksal2000, Guadalupe, KöksalxFlamura, KöksalxKaratopak, KöksalxLr19, AldanexKaratopak, İkizcexLr10, İzmirxKaratopak, TcHassasxKöksal, İzmirxLr19, FlamuraxLr10, FlamuraxKaratopak,FlamuraxLr19, BezostajaxKaratopak, AldanexKöksal F1 melezleridir.

Çalışmada bitki materyali olarak kullanılan çeşit ve hatların yetiştirilmesi ve melezleme çalışmaları 2013-2017 yıllarında Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma ve Deneme alanında gerçekleştirilmiştir. Deneme alanı topraklarının mekanik analizi sonucunda elde edilen değerlerden toprakların genellikle ağır bünyeli, pH gruplandırılmasında yarısından fazlasının orta lkalın grubuna girdiği, tuzluluk gruplandırılmasında tamamının tuzluluk yönünden bir problemi olmadığı belirtilmiştir (Deveciler 2005). Bursa İlinde iklim ise Karadeniz ile Akdeniz iklimleri arasında bir geçiş niteliği göstermektedir. Yaz dönemlerinde kuraklığın görülmediği ilde, kış ayları da çok sert geçmemektedir (Anonim 2010).

Çalışmada yer alan ve ıslahçıları tarafından arazi denemeleri sonucunda kahverengi pasa duyarlı, dayanıklı ve dayanıksız oldukları belirtilen ekmeklik buğday çeşitleri ve Thatcher hatlar 2013-2014 ve 2014-2015 üretim yıllarında tohum çoğaltmak amacıyla Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Araştırma ve Deneme Arazilerine ekilmiştir. 2014-2015 üretim yılında ise melez bahçeleri oluşturulmuş ve belirlenen genotipler arasında Nisan 2015 tarihinde 13 farklı kombinasyonda melezlemeler yapılmıştır. Elde edilen F1 tohumlarının tamamı ve çalışmada yer alan ekmeklik buğday çeşitleri ile Thatcher hatlar genomik çalışma yapmak üzere Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Tohumluk laboratuvarında çimlendirilip DNA izolasyonları yapılmıştır ve -20 °C kaldırılmıştır.

Kahverengi Pas Hastalığının Arazi Koşullarında Tanımlanması

Çalışmada yer alan çeşitlerin, kahverengi pas hastalığına dayanıklılıkları ıslahçıları tarafından

arazi ve seralarda yürütülen çalışmalar sonucunda gözleme dayalı olarak tespit edilmiş olup bu sonuçlar Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Çalışmada yer alan çeşitlerin, ıslahçıları tarafından belirtilen kahverengi pas hastalığına karşı dayanıklılık durumları

Table 1. The resistance of the cultivars in the study to brown rust disease stated by their breeders

Dayanıklı <i>Resistant</i>	Dayanaksız <i>Non-Resistant</i>	Bilinmiyor <i>Unknow</i>
Lr10	Gönen	Bezostaja
Flamura	Köksal 2000	Ceyhan
Aldane	TcHassas	Guadalupe
Karacabey	İkizce-96	Gün-91
Golia	İzmir-85	Gerek-79
Atilla-12		Köse
Karatopak		Pehlivan
Cumhuriyet		Kaşifbey
		Bayraktar
		Tairova
		Bandırma

Bazı çeşitlerin, kahverengi pas hastalığına dayanıklılık durumları ıslahçıları tarafından belirtilmediği için, başta bu çeşitler olmak üzere

Çizelge 2. Pas Hastalığına karşı gösterilen reaksiyon tipleri

Table 2. Reaction Types for Rust Disease

Konukçu Tepkisi <i>FungusResponse</i>	Enfeksiyon Tipi <i>Infection Type</i>	Hastalık Belirtisi <i>Leaf Rust symptom</i>
Dayanıklı	R	Nekrotik ve klorotik alanlar görülmekte, püstüller yok
Orta Dayanıklı	MR	Nekrotik ve klorotik alanlar görülmekte, püstüller çok küçük
Orta Duyarlı	MS	Küçükten orta büyüklüğe kadar püstüller görülmekte, nekrotik alan yok fakat belirgin klorotik alanlar bulunabilir
Duyarlı	S	Orta büyüklükte püstüller görülmekte, nekrotik alan yok, küçük klorotik alanlar görülebilir

R= 0,2; MR= 0,4; MS= 0,8; S= ise 1 değerlerini almaktadırlar.

Hastalık gruplandırması yapılırken; Enfeksiyon Katsayısı (E.K.) 0 (sıfır); reaksiyonu için immun, E.K. 1-5 reaksiyonu için; Dayanıklı, E.K. 6-20 reaksiyonu için; Orta Dayanıklı, E.K. 21-40 reaksiyonu için; Orta Hassas, E.K. 41-100 reaksiyonu için; Hassas yorumu yapılmıştır. Çalışmada yer alan her genotip için Enfeksiyon Katsayısı (EK) hesaplanmış olup Bulgular kısmında detaylı olarak açıklanmıştır.

Genomik DNA İzolasyonu

Çalışmada yer alan tüm genotipler laboratuvar ortamında küçük plastik kapların her birinin içerisine 10'ar tohum ekilerek oda sıcaklığında çimlendirilmiştir. Genomik DNA izolasyonu için bitkiler 14 gün sonra yaklaşık olarak 13-15 cm arasında boya ulaştıklarında yani üç yapraklı döneme geldiklerinde kullanılmışlardır. DNA izolasyonu için Qiagen Dneasy Plant Mini Kit kullanılmıştır.

DNA analiz sonuçlarının doğru değerlendirilmesi için PCR reaksiyonlarında yer alan her örnekten eşit yoğunlukta DNA kullanılması gereklidir. Her örnekten PCR aşamasında kullanılacak DNA miktarının yoğunluğu eşit olması için 50 mg/µl olacak

çalışmada yer alan tüm genotiplerin kahverengi pas hastalığına dayanıklılık gözlemleri tüm üretim yılları boyunca Cobb skalasına göre gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar hem moleküler çalışma sonuçları ile hem de ıslahçıların kendi çeşitleri için belirttikleri dayanıklılık durumlarıyla beraber bulgular kısmında değerlendirilmiştir.

Yapılan çalışmalarda arazide enfeksiyon oranının belirlenmesinde, hastalık şiddeti ve konukçu reaksiyonu enfeksiyon katsayısı olarak isimlendirilen tek bir değerle ifade edilmektedir. Bu değer, bitkinin bayrak yaprağında gözlenen reaksiyon tipine ve hastalığın şiddetinin yüzde (%) cinsinden verilen 2 değer çarpılması sonucu bulunmaktadır.

Kahverengi pas hastalık şiddetinin belirlenmesinde, Roelfs ve ark. (1992) geliştirdiği Cobb skalası tekniği uygulanmıştır. Buna göre; arazide ki buğday bitkilerinde, bayrak yaprağının pas püstülleriyle kaplı olan alanının tüm yaprak alanına olan oranı (%) hesaplanarak belirlenmektedir. Cobb skalasında; İz (2), 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 kademeleri kullanılmaktadır.

Çalışmada yer alan genotiplerin kahverengi pas hastalığına karşı gösterdikleri reaksiyon tipleri Peterson ve ark. (1948) yaptıkları çalışma sonucu belirledikleri skala dikkate alınarak belirlenmiştir (Çizelge 2).

şekilde ayarlanmıştır. PCR koşullarının çalışılan laboratuvarında doğru sonuçlar verebilmesi için standardizasyonun ve her primer için en uygun bağlanma sıcaklığı (Tm) çok iyi ayarlanması gerekmektedir. Çalışmada kullanılan PCR reaksiyon hacmi ve PCR döngüsü sırasıyla Çizelge 3 ve Çizelge 4'te verilmiştir.

PCR işleminde *LR10* geni için 20 baz dizilimli SSR primeri kullanılmıştır (Lr 10 (F): GTGTAATGCATGCAGGTTCC, Lr10 (R): AGGTGTGAGTGAGTTATGTT) bu primerin 310 bp'de bant vermesi beklenmektedir (Schachermayr ve ark. 1994, Schachermayr ve ark. 1997).

Çizelge 3. PCR reaksiyon hacmi

Table3. PCR reaction Volume

Genomik DNA	1 µl
Primer (F)	0,5 µl
Primer (R)	0,5 µl
MgSO ₄	3 µl
dNTP	0,5 µl
Taq DNA	1 µl
10Xbuffer	5 µl
ddH ₂ O	38,5 µl
Reaksiyon hacmi	50µl

Çizelge 4. PCR döngüsü

Table 4. PCR Cycle

İşlem	Sıcaklık	Süre	
Ön Denatürasyon	94 C ⁰	5 dk	
Denatürasyon	94 C ⁰	1 dk	
Bağlanma	62 C ⁰	1 dk	40
		Döngü	
Uzama	72 C ⁰	1 dk	
Son Uzama	72 C ⁰	10 dk	

PCR ürünleri Qiagen QIAxcel Advanced cihazında görüntülenmiştir. Ürünlerin bant ağırlıklarını belirlemek için 100 bp-10 kb'lık DNA yükleme markörü kullanılmıştır. PCR ürünlerinin Qiagen QIAxcel Advanced cihazına yüklenmesinin ardından çalışmada yer alan tüm genotiplerde *LR10* geni taranmıştır. Çalışmaların sonucunda ise literatürlerde belirtildiği gibi; Lr10 geni için 310 bp' de, bant oluşumları elde edilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

PCR ürünlerinde *LR10* geninin varlığının taranması için Qiaxcell Screengel 1.4 yazılımı kullanılmıştır. Kullanılan cihazda bantların hizalama işlemleri alignment marker (hizalama markör) ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 1 incelendiğinde, 1. sıradaki kuyucuğa Lr10 genini taşıyan yakın izogenik Lr10 hattı pozitif kontrol olarak yüklenmiş ve kalan 37 genotip şekil 1'de belirtildiği sırada Qiaxcell Advance Kapılar Sistemin kuyucuklarına yüklenmiştir. Birinci sırada yüklü olan pozitif kontrol (Thatcher Lr10), beklenildiği gibi 310 bp'de bant vermiştir. İncelenen genotiplerin bazıları Lr10'nu taşıyan 1 No'lu kuyucukda ki hat ile polimorfizm göstermiştir. Buna göre jel görüntüsünde 8 nolu kuyucukta yüklü bulunan Karatopak, 12 nolu kuyucukta yüklü olan Kaşifbey, 14 nolu kuyucukta yüklü olan Gün91 ekmeklik buğday çeşitlerinde Lr10 geninin varlığı belirlenmiştir. Kalan 19 çeşitte ve F1 melezlerinde Lr10 geni bulunmamaktadır.

Bu çalışmada elde edilen bulgulara paralel sonuçlar elde eden Kolmer ve ark. (2013) Türkiye'de pas hastalığının yaygın olarak görüldüğü 8 ilden topladıkları pas hastalık sporlarını 20 Thatcher hatta

inokule etmişlerdir ve dayanıklılıklarını incelemişlerdir. Çalışmalarının sonucunda Lr10 geninin Türk ekmeklik buğday çeşitlerinde az rastlandığı sonucuna ulaşmışlardır.

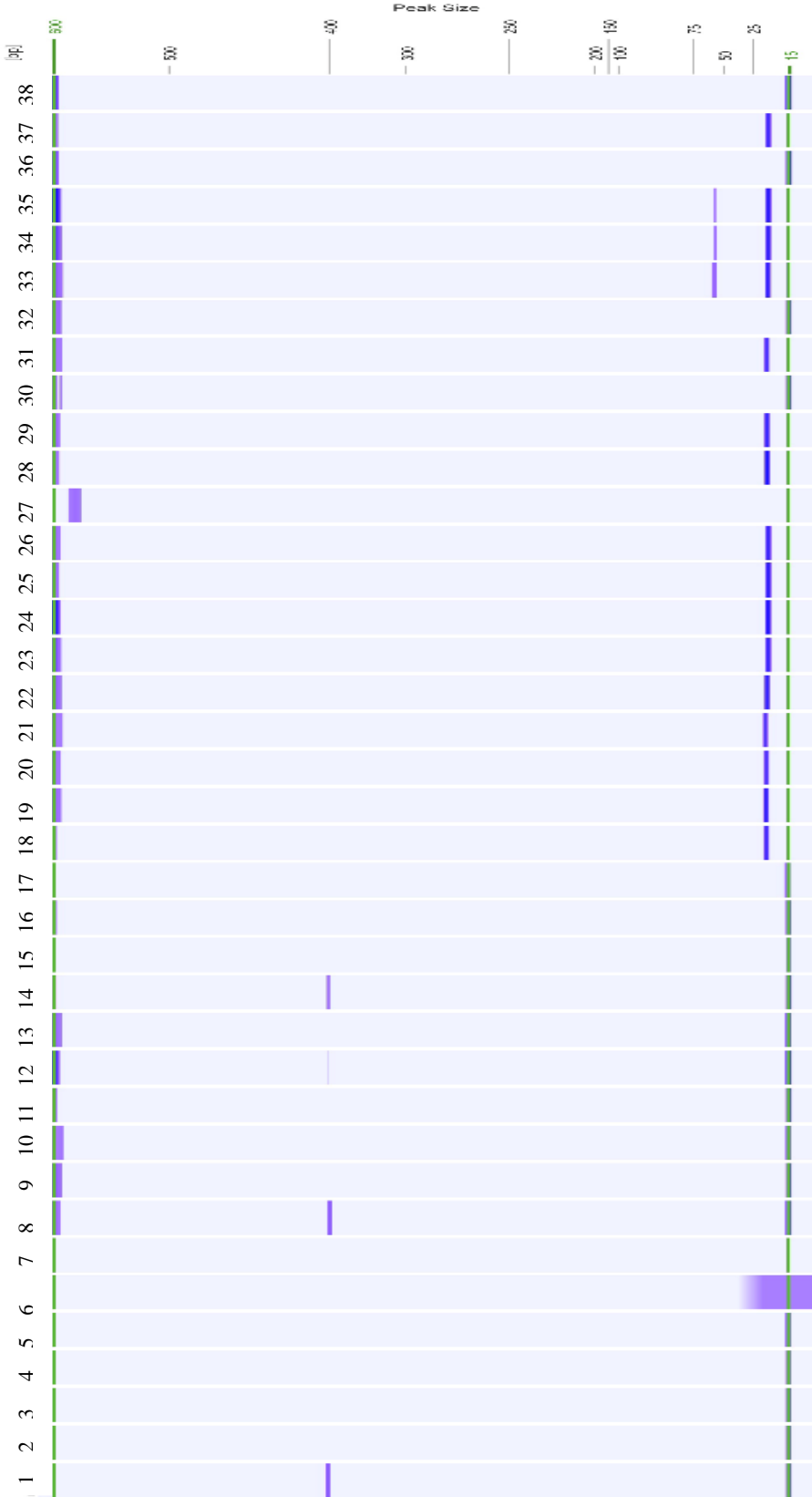
Hussain ve ark. (2011) Pakistan' da yaptıkları çalışmalarında 25 ekmeklik buğday çeşidinde SSR yöntemini kullanarak Lr10 genini taramışlardır ve sonuç olarak 18 çeşitte Lr10 genine rastlamışlardır, Stepien ve ark. (2003) İsviçre' de 37 ekmeklik buğday çeşidinde Lr10 genini taramışlar ve 16 çeşidin Lr10 geninin ihtiva ettiğini ortaya koymuşlardır. Hanzolavá ve ark. (2009) moleküler markör yönteminden SSR (mikrosatelit) kullanarak 27 ekmeklik buğday çeşidinde Lr10 genini taramışlar ve 10 çeşitte Lr10 genini bulmuşlardır. Vanzetti ve ark. (2011) Arjantinde yürüttükleri çalışmalarında yerel 66 ekmeklik buğday çeşidinde, Lr10 geninin de içinde bulunduğu toplamda 14 Lr geninin kahverengi pas hastalığına karşı dayanıklılık gücünü ölçmüşler ve Lr10 geninin tek başına çok düşük dayanıklılık gösterdiğini buna karşılık başka Lr genleri ile bir araya geldiğinde yüksek dayanıklılık gösterdiği sonucuna ulaşmışlardır.

Çalışmada yer alan genotiplerin pas hastalığına karşı Cobb skalasına göre sınıflandırılması yapılmıştır ve Enfeksiyon Katsayıları hesaplanarak Çizelge 5'de verilmiştir.

Çizelge 5'de Cobb skalasına göre değerlendirilen çeşitlerin, kahverengi pas hastalığına tepkileri verilmiştir. Buna göre ; L10, İzmir-85, Bandırma-97, Tahirova, Ceyhan-99, Gerek-79, Karatopak ve Golia çeşitleri dayanıklı grubunda yer alırken; Cumhuriyet, Karacabey-97, Bayraktar, Kaşifbey, Pehlivan, Köse 200/39, Guadalupe, Bezostaja orta dayanıklı, Aldane, İkizce-96, Atilla-12, Köksal-2000, Gün-91 orta hassas, Flamura, Gönen-98, TcHassas çeşitleri ise hassas grubunda yer almıştır.

Buğday çeşitlerinin kahverengi pas hastalığına karşı gösterdikleri dayanıklılık gücü, genomlarında taşıdıkları Lr genlerine ve bu genlerin diğer genlerle olan ilişkilerine göre en alt seviyeden en üst seviyeye kadar varyasyon göstermektedir. Bazı Lr dayanıklılık genleri tek başlarına kahverengi pas hastalığına karşı dayanıklılık gösteriyor olmasına karşın bazı Lr genleri bu kadar güçlü olamamakta ve tek başlarına bir genomda bulunmaları o çeşidin dayanıklılık göstermesine yetmemektedir (Urbanovich ark. 2006).

Bu sonuçlar doğrultusunda tüm genotiplere ait bant oluşumlarını yorumlandığımızda; 8 nolu kuyucukta yer alan Karatopak çeşidinde Lr10 geninin ihtiva ettiği belirlenmiştir. Karatopak çeşidi arazi koşullarında da kahverengi pasa dayanıklılık göstermiştir ve Cobb Skalasına göre 1 (5R) değerini almıştır.



1. kuyucuk: Thatcher Line-Lr10 (Pozitif Kontrol), 2. TcHassas, 3. Bayraktar, 4. Bezostaja, 5. Cumhuriyet, 6. Golia, 7. Bandırma-97, 8. Karatopak, 9. Gönen-98, 10. Köse 093/39, 11. Pehlivan, 12. Kaşifbey, 13. Aldane, 14. Gün91, 15. Tahirova-2000, 16. Flamura-85, 17. Ceyhan-99, 18. İkizce, 19. İzmir-85, 20. Atilla-12, 21. Gerek-79, 22. Karacabey-97, 23. Köksal 2000, 24. Guadalupe, 25. Lr19, 26. KöksalxFlamura (F1), 27. KöksalxKaratopak, 28. KöksalxLr19, 29. AldanexKaratopak, 30. İkizceLr10, 31. İzmirKaratopak, 32. TcHassasxKöksal, 33. İzmirLr19, 34. FlamuraxLr10, 35. FlamuraxKaratopak, 36. FlamuraxLr19, 37. BezostajaxKaratopak, 38. AldanexKöksal

Şekil 1. Lr10 primerinin hatlardaki sonuçları (310 bp)
Figure 1. Results of Lr10 primer in lines (310 bp)

Çizelge 5. Cobb Skalasına genotiplerin Kahverengi Pas Hastalığına Tepkileri

Table 5. Response of Genotypes to Brown Rust Disease in Cobb Scale

Çeşit İsmi Genotypes	Skala Değeri Scale Value	Çeşit İsmi Genotypes	Skala Değeri Scale Value
Flamura	80 (80S)	Bandırma-97	2 (10R)
Cumhuriyet	8 (10MS)	Köksal-2000	24 (30MS)
Aldane	40 (40S)	Pehlivan	6 (30R)
Karacabey-97	8 (20MR)	Tahirova	1 (5R)
Lr10	0,4 (2R)	Köse220/39	8 (20MR)
Lr19	1 (5R)	Ceyhan-99	2 (5MR)
Gönen-98	60 (60S)	Guadalupe	8 (20MR)
İzmir-85	1 (5R)	Gün-91	32 (40MS)
TcHassas	50 (50S)	Gerek-79	4 (20R)
Bayraktar	16 (40MR)	Bezostaja	10 (10S)
İkizce-96	40 (40S)	Karatopak	1 (5R)
Kaşifbey	6 (30R)	Golia	1 (5R)
Atilla-12	40 (40S)		

12 nolu kuyucukta yer alan Kaşifbey çeşidi ise 1 nolu hatta yer alan Lr10 ile polimorfizm gösteren bir diğer genotip olarak karşıya çıkmaktadır. Kaşifbey genotipinin çeşit özelliklerinde kahverengi pas hastalığına dayanıklılığı bilinmemektedir. Çizelge 5' de yer alan Cobb Skalası incelendiğinde Kaşifbey çeşidinin kahverengi pas hastalığına karşı, orta dayanıklı olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçta ise Kaşifbey çeşidinde Lr10 geninin varlığı belirlenmiştir. Bu sonuç doğrultusunda Kaşifbey ekmeklik buğday çeşitinde kahverengi pas hastalığına dayanıklılık genlerinden biri olan Lr10 geninin varlığı kanıtlanmıştır ancak bu sonuç Kaşifbey çeşidinin kahverengi pas hastalığına tamamen dayanıklı olduğu anlamına gelmemektedir. 37 genotip içinde 1 nolu hatta yer alan Lr10 genotipi ile polimorfizm gösteren son genotip ise 14 nolu kuyucukta yer alan Gün 91 çeşididir. Gün 91 çeşidinin de, ıslahçısı tarafından belirtilen özelliklerinde kahverengi pas hastalığına dayanıklılığı ifade edilmemiştir. Yapılan çalışma sonucunda Gün91 çeşidinin kahverengi pas hastalığına dayanıklılık geni olan Lr10'nu bünyesinde ihtiva ettiği sonucuna varılmıştır. Ancak bu çeşidin tarla gözlemleri diğer iki çeşitten farklı olarak 40 MS şiddetinde orta duyarlı olarak tespit edilmiştir. Bu durumda Gün 91 çeşidinin Lr10 genini taşımakla birlikte diğer kahverengi pas ırkalarına karşı dayanıklılık sağlayan genleri içermediğini göstermektedir.

Genotipler arasında yapılan melezlemelerde Lr10 genini taşıdığını belirlenen, Karatopak çeşidi 5 kombinasyonda baba hat olarak yer almıştır (Köksal x Karatopak; İzmir x Karatopak; Aldane x Karatopak; Bezostaja x Karatopak; Flamura x Karatopak). Melez kombinasyonlar incelendiğinde anne hat olarak kullanılan genotiplerden Aldane ve Flamura çeşitlerinin kahverengi pas hastalığına dayanıklı oldukları, Köksal 2000 ve İzmir 85 çeşitlerinin

dayanaksız olduğu, Bezostaja çeşidinin ise dayanıklılık durumunun bilinmediği ıslahçıları tarafından belirtilmiştir (Çizelge 1). Bu bilgiler doğrultusunda kahverengi pas hastalığına dayanıklı olduğu bilinen Aldane ve Flamura çeşitleri ile yapılan Karatopak melezlerinin kahverengi pas hastalığına dayanıklı olması beklenmektedir. Fakat melez kombinasyonlarının hiçbirinde Lr10 genine rastlanmamıştır. ıslahçıları tarafından kahverengi pas hastalığına dayanıklı olduğu belirtilen Aldane, Flamura çeşitlerinde de LR10 geni taranmış ve bu geni ihtiva etmedikleri görülmüştür. Bu sebeple, F1 melezleri ebeveynleri gibi kahverengi pas hastalığını karşı dayanıklı olabilirler fakat bu, Lr10 genini taşıdıkları anlamına gelmemektedir. Kahverengi pas hastalığına dayanıklılık sağlayan 63 adet Lr geni tespit edilmiştir (Stepien ve ark. 2003). Dolayısıyla buğday genotiplerinde kahverengi pas hastalığına karşı dayanıklılık bu genlerden bir tanesiyle sağlanabildiği gibi birkaç tanesinin kombinasyonu ile de sağlanabilmektedir. Bu sebeple Lr10 genini ihtiva etmemesine rağmen dayanıklılık gösteren çeşitlerin varlığı olağandır.

SONUÇ

Her geçen gün hızla artan Dünya nüfusunun büyük bir kısmının temel besin maddesi olan buğdayda verimdeki artış ancak hastalık ve zararlılara dayanıklı, stabilitesi yüksek ve her yönenin kendi ekolojik koşullarına uygun çeşitlerin geliştirilmesi ile sağlanabilmektedir. Uzun yıllar süren seleksiyonlarla genlerin belirli yönde seçilmesi ve melezlemelerde ortak anaçların kullanılması buğdayda genetik varyasyonu daraltmış ve istenen özellikleri taşıyan çeşitlerin klasik bitki ıslahıyla geliştirilmesini zorlaştırmıştır. Markör Destekli Seleksiyon (MAS) klasik ıslahı tamamlayıcı, oldukça hızlı, etkin, doğru ve ekonomik bir seleksiyon yöntemidir (Sönmezoğlu ve ark. 2010).

Kahverengi pas hastalığına dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesinde klasik ıslah yöntemleri ile kombine edilerek moleküler biyoteknoloji yöntemlerini kullanmak; zamandan, iş gücünden ve maliyetten kazanç sağlamaktadır. PCR temelli yöntemlerden, DNA markörleri, özellikle SSR (mikrosatellit) markörleri, en çok tercih edilen markör sistemini oluşturmaktadır (Özşensoy ve Kurar 2012).

Yürütülen bu çalışmada, Türkiye’de buğday üretiminde yoğunlukla yer alan ekmeklik buğday çeşitlerinde; kahverengi pas hastalığına karşı dayanıklılık geni olan *Lr10*un varlığı SSR (mikrosatellite) yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Ekmeklik buğdayda SSR tekniklerinin kahverengi pas dayanıklılık genlerini araştırmada kullanılabilir olduğu saptanmıştır. Gelecekte yürütülecek ıslah programlarında dayanıklılık genleri ihtiva eden çeşitlerin ebeveyn olarak kullanılmasının daha başarılı bir ıslah programı yürütülebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Teşekkür

Bu çalışma Pakize Özlem KURT POLAT’ ın Prof. Dr. Köksal Yağdı danışmanlığında Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde hazırladığı doktora tezinden üretilmiştir.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

- Aktaş H 2001. Önemli Hububat Hastalıkları ve Survey Yöntemleri. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü Bitki Sağlığı Araştırmaları Daire Başkanlığı, Ankara, 74sy.
- Anonim 2010. Bursa yöresi İklim Verileri. Bursa Meteoroloji Bölge Müdürlüğü, Yayınlanmamış Kayıtlar. BURSA
- Arslan Ü, Yağdı K, Aydoğan E 2002. Bursa İli Ekolojik Koşullarında Buğday Kahverengi Pası (*Puccinia recondita* Roberge ex Desmaz. f.sp. *tritici*)’na Karşı Bazı Ekmeklik Buğdayların Reaksiyonları ve Verim Kayıplarının Belirlenmesi. Ulud. Üniv. Zir. Fak. Derg., 16: 201-210.
- Babu R, Sudha K, Nair B, Prasanna M, Gupta S 2004. Integrating marker assisted selection in crop breeding Prospects and challenges. Urrent Science, 87 (5): 607-619.
- Çetiner S 2015. Türkiye Ve Dünyada Tarımsal Biyoteknoloji Ve Gıda Güvencesi: Sorunlar ve

Öneriler. <https://www.inovasyon.org/images/makaleler/sizdenBize/S.Cetiner.Inovasyon.org.pdf> (21.04.2021)

- Davoyan E R, Bespalova L A, Davoyan RO, 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.
- Deveciler H. 2005. Uludağ üniversitesi tarımsal uygulama ve araştırma merkezi tarım topraklarının ağır metal içeriklerinin incelenmesi. BUÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 50 sy.
- Eserkaya G T 2010. Yerel Makarnalık Buğday Çeşitlerinin Makarna Kalitesini Etkileyen y-gliadin genleri Bakımından Moleküler ve Biyokimyasal Analizleri. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 67 sy.
- FAO 2018. FAO Statistical Databases. <http://www.fao.org/faostat/en/#home>. (Erişim Tarihi: 21.04.2021)
- FAO 2019. FAO Statistical Databases <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. (Erişim Tarihi: 21.04.2021)
- Francia E, Rizza F, Cattivelli L, Stanca A M, Galiba G, Toth B, Hayes P M, Skinner J S, Pecchioni N 2004. Two loci on chromosome 5H determine lowtemperature tolerance in a ‘Nure’ (winter) x ‘Tremois’ (spring) barley map. Theor. Appl. Genet. 108: 670-680.
- Gupta P K, Varshney R K 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. Euphytica 113: 163–185.
- Hanzolavá A, Sumikova T, Bartos P 2009. Determination of Leaf Rust Resistance Genes *Lr10*, *Lr26* and *Lr37* by Molecular Markers in Wheat Cultivars Registered in the Czech Republic. Czech J. Genet. Plant Breed., 45 (2):79-84
- Hussain W, Habib A, Iqbal M S, Abbassi F B, Wesal A, Hussain S 2011. Identification of Leaf Rust Resistant Gene *Lr10* in Pakistani Wheat Germplasm. African Journal of Biotechnology 10 (43): 8578-8584.
- Hoisington D, Khairallah M, Reeves T, Ribaut J M, Skovmand B, Taba S, War Burton M 1999. Plant Genetic Resources: What Can They Contribute Toward Increased Crop Productivity? Proc Natl. Acad. Sci. (96): 5937-5943.
- Jones N, Ougham H, Thomas H 1997. Markers and mapping: we are all geneticists now, New Phytol. 137: 165–177.
- Kolmer J A, Mert Z, Akan K, Demir L, Ünsal R, Şermet C, Keser M, Akin B, Morgounov A 2013.

- Virulence of *Puccinia triticina* in Turkey and leaf rust resistance in Turkish wheat cultivars. *Eur J Plant Pathol.* 135:703–716.
- Messmer M M, Seyfarth R, Keller M, Schachermayr G, Winzeler M, Zanetti S, Feuillet C, Kelle B 2000. Genetic analysis of durable leaf rust resistance in winter wheat. *Theor Appl Genet.* 100: 419–431.
- Ovesna J, Polakova K, Leisova L 2002. DNA analyses and their Applications in Plant Breeding. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 38 (1): 29–40.
- Özşensoy Y, Kurar E 2012. Markör Sistemleri ve Genetik Karakterizasyon Çalışmalarında Kullanımları. *Journal of Cell and Molecular Biology* 10 (2):11 19.
- Peterson R F, Campbell A B, Hannah A E 1948. A Diagrammatic Scale For Estimating Rust Intensity On Leaves And Stems Of Cereals. *Canadian Journal of Research*, 26c(5): 496-500.
- Roelfs A P, Singh R P, Saari E E 1992. Rust Diseases of Wheat: Concepts and methods of disease management. Mexico, D.F.: CIMMYT. 81 sy.
- Schachermayr G, Siedler H, Gale M D, Winzeler H, Winzeler M, Keller B 1994. Identification and localization of molecular markers linked to the Lr9 leaf rust resistance gene of wheat. *Theor Appl Genet.* 88 (1): 110-115.
- Schachermayr G, Feuillet C, Keller B 1997. Molecular markers for the detection of the wheat leaf rust resistance gene *Lr10* in diverse genetic backgrounds. *Molecular Breeding* 3: 65–74.
- Sönmezoğlu Ö A, Yıldırım A, Eserkaya Güleç, Kandemir N 2010. Markör Destekli Seleksiyonun Bugday Islahında Kullanımı. *GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 27(1): 105-112.
- Stepien L, Golka L, Chełkowski J 2003. Leaf rust resistance genes of wheat: identification in cultivars and resistance sources. *J. Appl. Genet.* 44 (2): 139-149.
- Urbanovich O Y, Malyshev S V, Dolmatovich T V, Kartel N A 2006. Identification of Leaf Rust Resistance Genes in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivars Using Molecular Markers. *Russian Journal of Genetics*, 42 (5): 546-554.
- Vanzetti, L.S., Campos, P., Demichelis, M., Lombardo, L.A., Aurelia, P.R., Vaschetto, L.M., Bainotti, C.T., Helguera, M. 2011. Identification of leaf rust resistance genes in selected Argentinean bread wheat cultivars by gene postulation and molecular markers . *Electronic Journal of Biotechnology.* 14(3) : 9-9.
- Watson, I.W., Singh, D., 1952. The future of rust resistant wheat in Australia. *J. Aust. Inst. Agric. Sci.* 18: 190-197.