



Araştırma Makalesi/Reserach Article

Hızlı Islah Teknolojisi ve Markör Destekli Geriye Melez Yöntemiyle Hasat Öncesi Başakta Çimlenmeye Toleranslı Ekmeklik Buğday Genotiplerinin Geliştirilmesi

Elif Yayla¹  Tuğba Güleç^{2*}  Mesut Ersin Sönmez¹  Bedrettin Demir¹ 
Zeki Mut³  Nevzat Aydın¹ 

¹Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Karaman, Türkiye

²Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, TBMYO, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Karaman, Türkiye

³Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Bilecik, Türkiye

*Sorumlu yazar: tuba.eserkaya@gmail.com

Geliş Tarihi: 26.04.2021

Kabul Tarihi: 10.09.2021

Öz

Hasat dönemindeki yağışlar buğdayda hasat öncesi başakta çimlenmeye neden olabilmektedir. Buğday kalitesini ve pazar değerini olumsuz yönde etkileyen hasat öncesi başakta çimlenme için alınabilecek önlemlerin başında dormant çeşitlerin geliştirilmesi gelmektedir. Çalışmada, Nevzatbey, Adana-99 ve Tosunbey x Tahirova-2000 melezi sonucu elde edilen 127 kodlu buğday genotipleri ve genitör olarak Rio Blanco buğday çeşidi kullanılmıştır. Genotiplerin tamamı beyaz tanelidir. Bitkiler, hızlı ıslah teknolojisi kullanılarak yetiştirilmiş ve ıslah yöntemi olarak markör destekli geriye melez yöntemi kullanılmıştır. Bitkiler günde 21 saat LED ışık altında ve 25 °C'de ışıklı periyotta, 3 saat karanlık ve 18 °C'de yetiştirilmiştir. Generasyon süresi vernalizasyon süresi hariç 53-80 gün arasında değişmiştir. Bütün melez kombinasyonlarda toplam 90 adet bitki yetiştirilmiştir. GM₁F₁ generasyonundaki tohumlardan 54 tanesi hedef geni heterozigot olarak taşımaktadır. Bu tohumlar GM₁F₂ generasyonunun bitkilerini üretmek için kullanılmıştır. GM₁F₂ generasyonundaki 27 adet genotipin hedef geni homozigot olarak taşıdığı moleküler olarak saptanmıştır. Hızlı ıslah teknolojisi buğdayda generasyon süresini kısaltabilir ve geriye melez hatlar hasat öncesi başakta çimlenmeye toleranslı beyaz taneli çeşitlerin geliştirilmesinde kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Beyaz taneli ekmeklik buğday, Hızlı ıslah teknolojisi, Hasat öncesi başakta çimlenme

Development of Bread Wheat Genotypes Tolerant to Pre-Harvest Sprouting by Speed Breeding Technology and Marker-Assisted Backcross Method

Abstract

The rainfall during the harvest period may cause the pre-harvest sprouting in wheat. The development of dormant varieties is one of the most important precautions for pre-harvest sprouting, negatively affecting the wheat quality. Nevzatbey and Adana-99 cultivars, and 127 coded wheat, a line obtained from Tosunbey x Tahirova2000 crossing were used in study. Rio Blanco, a white winter wheat cultivar, was used as a genitor for pre-harvest sprouting. All genotypes used in the research had white grain. The plant grew under speed breeding technology conditions, and the marker-assisted backcross method was used as the breeding method. Growing conditions were 25 °C under LED light for 21 hours as the lighted period, the remaining 3 hours at 18 °C with the lights off. The duration of backcross generations varied from 53 to 80 days, excluding the vernalization period. All backcrosses included a total of 90 plants. Fifty-four of the seeds in the GM₁F₁ generation carried the target gene heterozygously. These seeds were grown to produce plants of the GM₁F₂ generation. Twenty-seven lines with target gene homozygously in the GM₁F₂ generation existed. Speed breeding technology could shorten the generation time in wheat, and the backcross lines could be used to develop white-grain wheat cultivars to tolerant pre-harvest sprouting.

Keywords: White grain bread wheat, Speed breeding technology, Pre-harvest sprouting

Giriş

Gıda ihtiyacının karşılanmasında önemli bir yere sahip olan tahıllar, insan ve hayvan beslenmesindeki önemi ve geniş adaptasyon yeteneği nedeniyle yaygın olarak tarımı yapılan bir bitki



grubudur. Buğday dünyada günlük kalori ve protein ihtiyacının yaklaşık %20'sini karşılaması yanında (Peng ve ark., 1999; Atak, 2017), besin içeriği zengin bir tahıl türüdür (Öktem, 2020).

Yaşanması öngörülen iklim değişikliği, güvenli gıda temini yanında ekosistemi ve türleri tehdit etmektedir (Brambilla ve ark., 2018). 1860-2008 yılları arasındaki verilere göre küresel sıcaklıkta 0.5-0.8 °C arasında bir artış gözlenmiştir (Andrady ve ark., 2008). Bu durum özellikle kurak bölgelerde aşırı yağışın ve sert rüzgarların oluşmasına sebep olmaktadır (Baysal, 2014). Bunun sonucunda birçok ülkede buğday üretimi yapılan alanlar hasat döneminde yoğun yağmur yağışı alabilmektedir. Şiddetli yağış ve nem, olgunlaşmış buğday tanesinde hasat öncesi çimlenmeye neden olabilmektedir (Fakthongphan ve ark., 2016).

Buğdayda hasat öncesi başakta çimlenmenin yaşanması hem bitkinin genetik yapısına hem de tane gelişimi dönemindeki hava şartlarına bağlıdır (Fakthongphan ve ark., 2016). Hasat öncesi başakta çimlenme, dünya üzerinde birçok buğday yetiştirme alanlarında, buğday tanelerinin verim ve kalitesinde önemli azalmaya sebep olmaktadır (Flintham, 2000; Kottarachchi ve ark., 2006). Hasat öncesi başakta çimlenme nedeniyle yaşanan ekonomik kayıpların önlenmesinde en hızlı ve ekolojik yöntem hasat sonrası dormansi özelliğine sahip genotiplerin geliştirilmesidir.

Tohumların çimlenme yeteneğine sahip olduğu halde çimlenmesini engelleyen özellik dormansi olarak bilinmektedir (Bewley, 1997). Dormansi gerek çevre şartlarının etkisiyle gerekse genotipik özelliklerin etkisiyle tohumun çimlenmesini engellemektedir (Bewley ve Black, 1994; Vleeshouwers ve ark., 1995). Dormansi, doğada tohumun canlı kalmasını sağlarken, aynı zamanda hasat öncesinde yaşanabilecek çimlenmeleri de engellemektedir (Thomason ve ark., 2019). Tohumun dormansi özelliği taşınamaması hasat öncesi başakta çimlenmenin en önemli nedenlerinden biridir (Li ve ark., 2004).

Tohum dormansisi yanında başağın morfolojik özellikleri, özellikle çiçeklenme sonrasındaki iklim şartları ve tohum rengi de buğdayda hasat öncesi başakta çimlenmeyi etkilemektedir (Flintham, 1999). Yapılan araştırmalar, tohum rengi ile hasat sonrası dormansi arasında pleiotropik bir etki olduğunu ve genel olarak beyaz taneli buğdayların kırmızı taneli buğdaylara oranla başakta çimlenmeye daha hassas olduğunu göstermiştir (Morris ve Paulsen, 1992; Mares ve ark., 2005). Tohum kabuğunun kırmızı pigmentasyonu uzun zamandır hasat öncesi başakta çimlenmeye tolerans için morfolojik markör olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte tane renginden bağımsız olarak hasat öncesi başakta çimlenmeye tolerans sağlayan genotipik kaynaklar da bulunmaktadır (Vetch ve ark., 2019).

Hasat öncesi başakta çimlenmeye toleransın kantitatif olarak kontrol edilen ve çevreden etkilenen karmaşık bir özellik olması nedeniyle toleranslı genotiplerin geliştirilmesi zorlu bir ıslah hedefi olarak görülmektedir. Genetik çalışmalar hasat öncesi başakta çimlenmeye tolerans ile bağlantılı genlerin çoğunlukla 2B, 3A ve 4A kromozomunda bulunduğunu göstermektedir (Graybosch ve ark., 2013). Fenotipik analizlerin zahmetli ve deneme hatasının yüksek olması nedeniyle özelliğin seçimi ve araştırılmasında markör destekli seleksiyon önemli bir yere sahiptir (Kulwal ve ark., 2005; Kottarachchi ve ark., 2006).

Markör destekli seleksiyon, ıslah için önemli olan kantitatif karakterlerin etkin ve hızlı bir şekilde aktarılmasını sağlamaktadır. Markör destekli seleksiyon ıslah çalışmaları çoğunlukla geriye melezleme yöntemiyle birlikte kullanılmaktadır (Yıldırım ve Kandemir, 2001). Kulwal ve arkadaşları (2005) yaptıkları araştırmada 3A kromozomu üzerinde hasat öncesi başakta çimlenmeye ilişkili bir QTL tespit etmiş (*Qphs.cdu3A.1*) ve bu özellik için ortaya çıkan varyasyonun %78'inin bu QTL'den kaynaklandığını saptamışlardır. Aynı zamanda altı farklı çevrede etkili olabilen bu QTL markör destekli seleksiyon yöntemi ile beyaz taneli buğdaylara aktarılabilceği belirlenmiştir. Kanada'da yapılan bir araştırmada, yazlık buğday gen kaynakları hasat öncesi başakta çimlenme özelliği bakımından incelenmiş ve genotipik varyansın araştırmada kullanılan materyal için düşme sayısı, çimlenme indeksi ve başakta çimlenme indeksi bakımından fenotipik varyansa oranla daha fazla olduğu belirlenmiştir (Rasul ve ark., 2012). Bu sonuçlar mevcut materyalin başakta çimlenmeye dayanıklılık ıslahında kullanılabileceğini göstermiştir. Bir başka çalışmada, hasat öncesi başakta çimlenmeye toleranslı Rio Blanco isimli beyaz taneli buğday ile hasat öncesi başakta çimlenmeye duyarlı olan NW97S186 çeşidinin melezlenmesi sonucu 171 hattın yer aldığı bir haritalama popülasyonu geliştirilmiştir. Ebeveyn ve tüm hatlar 1430 çift SSR primer ile taranmıştır. Bu çalışmanın sonucunda 3A kromozomunun kısa kolunda hasat öncesi başakta çimlenmeye ilişkili bir



QTL tanımlanmış (*QPhs.pseru-3AS*) ve bu QTL'in fenotipik varyasyonun %58'ini açıkladığı saptanmıştır (Liu ve ark., 2008).

Bitki ıslahında generasyon süresinin kısaltılması amacıyla yürütülen çalışmalar sonucunda son olarak hızlı ıslah teknolojisi geliştirilmiştir. Normal sera şartlarında 2-3 generasyon buğday yetiştirilirken, hızlı ıslah teknolojisi kullanılarak ekmeklik buğday, makarnalık buğday, çavdar, arpa ve nohut bitkilerinde yılda 6 generasyona kadar ürün alınmıştır (Watson ve ark., 2018). Hızlı ıslah teknolojisi, ışıklandırma süresinin uzatılması, tohumlarının olgunlaşmadan önce hasat edilmesi ve tohum dormansisinin kırılması için soğuk uygulaması olmak üzere üç temel uygulama içermektedir (Ghosh ve ark., 2018). Hızlı ıslah teknolojisi, yüksek verimli genotipleme, genom düzenleme ve genomik seleksiyon gibi modern ürün yetiştirme teknolojileriyle entegre edildiğinde büyük bir potansiyele sahiptir (Watson ve ark., 2018). Hızlı ıslah teknolojisi yazlık buğdayda dormansi, sarı pas ve kahverengi pas hastalıklarını konu alan araştırmalarda kullanılmıştır (Hickey ve ark., 2010; Riaz ve ark., 2016; Alahmad ve ark., 2018). Hızlı ıslah teknolojisinin dünyada ve Türkiye'de kullanımı yaygınlaşmaktadır.

Bu çalışma kapsamında hızlı ıslah teknolojisi ve markör destekli geriye melez yöntemi kullanılarak ekmeklik buğday genotiplerine hasat öncesi başakta çimlenmeye dayanıklılık sağlayan *PHA XBarc321* gen bölgesi moleküler olarak tanımlanarak transfer edilmiş ve ilgili bölgeyi taşıyan geriye melez hatlar geliştirilmiştir.

Materyal ve Yöntem

Çalışmada Rio Blanco × Nevzatbey, Rio Blanco × Adana-99 ve Rio Blanco × 127 melezlerinden elde edilmiş GM_1F_1 ve GM_1F_2 populasyonları genotiplere ait bitki materyali geliştirilmiştir. Rio Blanco çeşidi beyaz taneli bir buğday çeşididir ve hasat öncesi çimlenmeye dayanıklıdır. Bu çeşidin dayanıklılık kaynağı genotipik araştırmalar sonucunda tespit edilmiştir (Liu ve ark., 2008). Bununla birlikte, Nevzatbey, ve Adana-99 çeşitleri ve 127 kodlu genotip hasat öncesi çimlenmeye karşı toleransları belirlenmiştir ve bu genotipler yüksek seviyede toleranslı genotipler değildir. Her bir melez populasyonunda yaklaşık olarak 30'ar adet melez tohum kullanılmıştır. Hedef geni heterozigot olarak taşıyan bu tohumlardan GM_1F_2 generasyonuna ait tohumlar yetiştirilmiş ve hedef geni homozigot olarak taşıyan bireylerin seçimi gerçekleştirilmiştir.

Bitkilerin hızlı ıslah yöntemiyle yetiştirilmesi

Bitkiler, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi'nde bulunan hızlı ıslah çalışmaları için tesis edilen bitki büyütme odasında yetiştirilmiştir. Tohumlar önce 4 °C'de 30 gün süreyle vernalize edilmiştir. Bitki büyütme odasında LED lambaları farklı lux şiddetlerinde ayarlanmıştır. Bitkiler LED'den 40 cm uzaklıkta iken 11800 lux, 50 cm uzaklıkta iken 9800 lux, 60 cm uzaklıkta iken 8300 lux, 70 cm uzaklıkta iken 7300 lux, 80 cm uzaklıkta iken 6400 lux, 90 cm uzaklıkta iken 5700 lux ve 100 cm uzaklıkta iken 5000 lux ışık altında kalmışlardır. Farklı yüksekliklerde sağlanan ışığın lux değerleri Trotec BF06 Luxmeter ile ölçülmüş ve LED üreticisi firma tarafından verilen katsayı ile çarpılarak PPF (Photosynthetic Photon Flux Density) değeri $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ olarak belirlenmiştir. PPF değeri metrekaareye saniyede düşen foton miktarını göstermektedir.

Tohumlar bitki büyütme odasında LED lamları altında 21 saat ışıklı periyot ve 3 saat karanlık periyot kullanılmıştır. Işıklı periyotta oda sıcaklığı 25 °C, karanlık periyotta ise 18 °C derece olarak ayarlanmıştır. Bitki gelişme dönemleri olarak birinci yaprak çıkış süresi, üçüncü yaprak çıkış süresi, gebecik, başaklanma süresi, çiçeklenme süresi ve hasat tarihi gözlenmiştir. Hızlı ıslah yönteminde tohumlar çiçeklenmeden 15-20 gün sonra hasat edilmiş ve inkübatörde 37 °C'de yedi gün süreyle kurutulmuştur. Kurutulan tohumlar buzdolabında 4 °C'de beş gün tutulmuştur. Çalışmada kullanılan tohumlar dormansi genlerini taşıyacağı için çimlendirme işleminde %0.005'lik giberallik asit kullanılmıştır.

DNA izolasyonu

DNA izolasyonu Thermo Scientific Gene JET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit ile iki-üç yapraklı dönemde bitki genç yaprağından alınan örneklerde yapılmıştır. DNA örnekleri %0.8'lik agaroz jele yüklenmiştir. Jele yüklenen örnekler 100 voltta (V) 60 dakika yürütülmüştür.

Moleküler Analiz

Araştırmada kullanılan primer dizilerine ilişkin bilgiler Çizelge 1'de verilmiştir. Araştırmada hasat öncesi başakta çimlenmeye toleransın genotipik olarak belirlenmesi için '*PHA XBarc321*'



primeri kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) protokolü Liu ve ark. (2008)'nin belirttiği şekilde yapılmıştır.

Çizelge 1. Araştırmada kullanılan primer sekansları

Primer	Primer dizisi	Pozitif Bant Uzunlukları	Negatif Bant Uzunluğu	Referans
PHA	5' TGCACTTCCCACAACACATC 3'			Liu ve ark.,
XBarc321	5' TTGCCACGTAGGTGATTTATGA 3'	185 bp	198 bp	2008

Agronomik özelliklerin belirlenmesi

Çalışmada üç farklı melez kombinasyonu kullanılmıştır. Rio Blanco kışlık bir buğday olup Nevzatbey ve Adana-99 çeşitleri ve 127 kodlu hatla (Tosunbey x Tahirova2000) melezlenmiş ve F₁ tohumları elde edilmiştir. Nevzatbey ve Adana-99 çeşitleri ve 127 kodlu hat tekrarlanan ebeveyn olarak kullanılmış ve GM₁F₁ generasyonuna ait tohumlar elde edilmiştir. F₁ ve GM₁F₁ generasyonuna ait tohumlar kontrollü araştırma serasında elde edilmiştir. GM₁F₁ ve GM₁F₂ generasyonlarına ait bitkiler hızlı ıslah için tesis edilen bitki büyütme odasında yetiştirilmiştir. GM₁F₁ generasyonundaki tohumlar moleküler olarak taranarak hedef geni heterozigot durumda taşıyanlar GM₁F₂ generasyonundaki bitkilerin yetiştirilmesi amacıyla kullanılmıştır. Her bir generasyondan 30'ar adet tohum seçilmiştir. Tohum seçimi yapılan RioBlanco × Nevzatbey, RioBlanco × Adana-99 ve RioBlanco × 127 melez kombinasyonlarından seçilen tohumlar yaklaşık melez kombinasyonlara göre değişmek üzere farklı sürelerde 4°C'de cam petri kapları içerisinde vernalize edilmiştir. Tohumlar vernalizasyon işleminden sonra 0.3 litre hacmindeki plastik saksılara ekilmiştir. Vernalize edilen bu tohumlar hızlı ıslah çalışmalarının yürütüldüğü bitki büyütme odasında yetiştirilmiştir. Çalışmada, birinci yaprak çıkışı, üçüncü yaprak çıkışı, gebecik, başaklanma süresi, çiçeklenme süresi ve hasat zamanlarına ilişkin veriler alınmıştır. Üçüncü yaprağı çıkaran bitkilerin yapraklarından örnek alınıp DNA izolasyonu ve moleküler taramalar gerçekleştirilmiştir. Moleküler tarama sonucunda hedef geni heterozigot olarak taşıyan tohumlar belirlenmiş ve bu tohumlar çiçeklenme süresinden yaklaşık 17-20 gün sonra hasat edilmiştir. Hasat edilen başaklar bir hafta boyunca inkübatörde 37 °C'de kurutulmuştur.

Hedef geni heterozigot olarak taşıyan bitkilerden elde edilen GM₁F₂ tohumlarından her bir melez kombinasyonu için yaklaşık 20'şer adet seçilen tohumlar hızlı ıslah şartlarında tekrar yetiştirilmiş ve moleküler analizler sonucunda hedef geni homozigot olarak taşıyan bitkiler saptanmıştır.

Bulgular ve Tartışma

GM₁F₁ generasyonundaki bitkilerin yetiştirilmesi

GM₁F₁ generasyonundaki bitkilerin ekimi ve hasat zamanı arasında geçen gelişim dönemlerine ilişkin veriler Çizelge 2'de verilmiştir. Melez kombinasyonlar farklı vernalizasyon süresine göre iki farklı zamanda ekilmiştir. Üç melez kombinasyonda hem 40 gün hem de 48 gün süreyle vernalize edilen bitkilerde birinci ve üçüncü yaprak çıkarma süreleri aynıdır. Birinci ve üçüncü yaprakların çıkış süresi sırasıyla 5 ve 8 günde tamamlanmıştır. Başaklanmanın en erken yaşandığı melez kombinasyonu Rio Blanco × Adana-99 melez kombinasyonudur. Benzer şekilde bu kombinasyon en erken hasat edilen melez kombinasyonu olmuştur. Bu durumun Adana-99 çeşidinin yazlık olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Rio Blanco × Adana-99 melez kombinasyonunun vernalizasyon süresi 40 ve 48 gün olduğunda sırasıyla 58 ve 55 günde hasat edilmiştir (Çizelge 2).

Çalışmada, Rio Blanco × Nevzatbey melez kombinasyonunun en uzun başaklanma ve generasyon süresine sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 2). Bu kombinasyonda 40 gün süreyle vernalize edilen bitkiler 71 günde hasat edilirken, 48 gün vernalize edilen bitkiler 65 günde hasat edilmiştir. Rio Blanco × Nevzatbey melez kombinasyonunun diğer iki kombinasyona oranla daha geç hasat edilmesinde her iki çeşidin de mutlak kışlık olmalarının önemli etkisinin olduğu düşünülmektedir. Çizelge 2'de görüldüğü üzere Rio Blanco × 127 melez kombinasyonunun GM₁F₁ generasyonuna ait bitkilerinde başaklanma süresi vernalizasyon sürelerine göre 40 ve 36 günde

gerçekleşmiştir. Bitkilerin çiçeklenmeleri ise başaklanmadan sonra 3-5 gün içerisinde olmuştur. Bu kombinasyonda, generasyon süresi 40 gün vernalize edilen bitkilerde 62 günde, 48 gün vernalize edilen bitkilerde ise 60 günde tamamlanmıştır.

Çizelge 2. GM₁F₁ generasyonundaki hatlarının gelişim süreleri (gün)

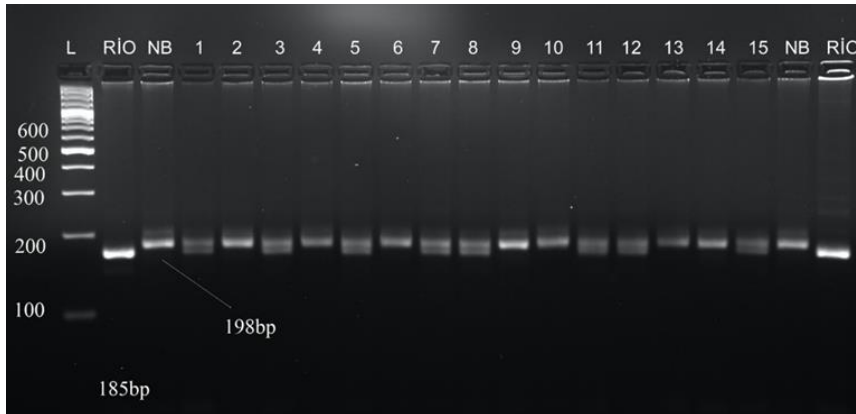
Gelişim dönemleri	Rio Blanco x Nevzatbey		Rio Blanco x Adana-99		Rio Blanco x 127	
Vernalizasyon süresi	40	48	40	48	40	48
Ekim tarihi	12.12.2018	20.12.2018	12.12.2018	20.12.2018	12.12.2018	20.12.2018
1. yaprak çıkışı	5	5	5	5	5	5
3. yaprak çıkışı	8	8	8	8	8	8
Gebecik	37	33	30	25	36	30
Başaklanma süresi	45	41	33	32	40	36
Çiçeklenme süresi	50	44	38	35	43	40
Hasat tarihi	71	65	58	55	62	60

Kışlık (Rio Blanco) × kışlık (127 kodlu) melezi olan bu kombinasyonda generasyon süresi yazlık × kışlık melezi olan Rio Blanco × Adana-99 kombinasyonuna yakın sürelerde tamamlanmıştır. Bütün melez kombinasyonlar dikkate alındığında melez kombinasyonların hasat süreleri hızlı ıslah yöntemini ilk geliştiren ve uygulayan araştırmacıların sonuçları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (Ghosh ve ark., 2018; Watson ve ark., 2018).

GM₁F₁ generasyonundaki bitkilerin moleküler analizleri

DNA izolasyonu yapılan bitkilerin hasat öncesi başakta çimlenmeye dayanıklılık sağlayan hedef genlerinin moleküler olarak belirlenmesi için PZR yöntemi kullanılmıştır. PZR işleminde primere ait belirlenen sıcaklıklara uygun bir prosedür uygulanmış ve gen bölgesini taşıyan heterozigot genotipler agaroz jel üzerinde çift bant taşıyor olmalarına göre seçilmiştir (Şekil 1). Hasat öncesi başakta çimlenmeye dayanıklılık sağlayan QTL'in varlığı 185 bç bölgesinde bant vermesi, bu bölgenin bulunmaması ise 198 bç bölgesinde bant vermesi ile belirlenmiştir (Şekil 1). GM₁F₁ generasyonundaki heterozigot hatlar bu iki gen bölgesinde bant üretmesiyle belirlenmiştir

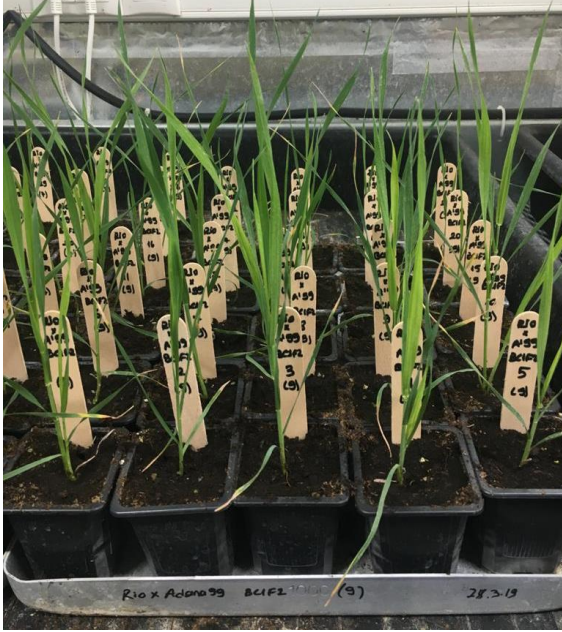
Rio Blanco × Nevzatbey melez kombinasyonunun GM₁F₁ bitkileriyle gerçekleştirilen PZR işlemleri sonucunda 17 adet heterozigot hat belirlenmiştir (Şekil 1). RioBlanco × Adana-99 melez kombinasyonunun GM₁F₁ bitkilerinden 20 adet heterozigot hat ve Rio Blanco × 127 melez kombinasyonunun GM₁F₁ bitkilerinden 15 adet heterozigot hat belirlenmiştir. Hedef geni taşıyan bitkilerden elde edilen tohumlar GM₁F₂ generasyonunun yetiştirilmesi için seçilmiştir.



Şekil 1. GM₁F₁ generasyonundan bazı örneklerin %2.5'lük agaroz jel görüntüsü (RIO: Rio Blanco, NB: Nevzatbey)

GM₁F₂ generasyonundaki bitkilerin yetiştirilmesi

Rio Blanco buğday çeşidi ile melezlenen Nevzatbey, Adana99 ve 127 genotiplerinin hedef gen bölgesini heterozigot olarak taşıyan GM₁F₂ generasyonundaki tohumları hızlı ıslah büyütme odasında yetiştirilmiştir. GM₁F₁ generasyonundaki uygulanan yetiştirme işlemlerinin tamamı GM₁F₂ generasyonundaki bitkilerin yetiştirilmesinde de uygulanmıştır (Şekil 2). GM₁F₂ tohumlarının yetiştirilme süreleriyle ilgili veriler Çizelge 3’de verilmiştir.



Şekil 2. RioBlanco x Adana-99 melez kombinasyonu GM₁F₂ bitkileri.

GM₁F₂ generasyonundaki tohumların vernalizasyon işlemi bir önceki generasyondan farklı olarak geniş spektrumlu LED lambaların bulunduğu iklim dolabında gerçekleştirilmiştir. Özellikle Rio Blanco × Nevzatbey melez kombinasyonunda başaklanmanın oldukça geç başlaması nedeniyle bu kombinasyonun vernalizasyon süresi uzatılmıştır. Bununla birlikte Adana-99 çeşidinin yazlık olması nedeniyle bu çeşidin yer aldığı melez kombinasyonunda vernalizasyon süresi azaltılarak 30 ve 37 gün olarak uygulanmıştır. Rio Blanco × 127 melez kombinasyonunda ise vernalizasyon süresi bir önceki generasyona benzer şekilde yapılmıştır.

Çizelge 3. Melezlerin GM₁F₂ hatlarının gelişme süreleri (gün).

Gelişim dönemleri	Rio Blanco x Nevzatbey		Rio Blanco x Adana-99		Rio Blanco x 127	
Vernalizasyon süresi	52	54	30	37	37	44
Ekim tarihi	19.04.2019	21.04.2019	28.03.2019	04.04.2019	04.04.2019	11.04.2019
1. yaprak çıkışı	Var	Var	Var	Var	Var	Var
3. yaprak çıkışı	10	11	7	6	6	6
Gebecik	55	53	25	20	25	29
Başaklanma süresi	59	58	30	28	36	37
Çiçeklenme süresi	61	61	35	33	41	41
Hasat tarihi	80	80	55	53	60	60

Çizelge 3’te görüleceği üzere GM₁F₂ generasyonundaki bitkilerde ışıklı şartlarda vernalizasyon yapılmış olması nedeniyle birinci yaprakların çıkışı gerçekleşmiştir. Melez kombinasyonların üçüncü yaprak çıkış süreleri Rio Blanco × Adana-99 ve Rio Blanco × 127



melezlerinde ayniyken Rio Blanco × Nevzatbey melez kombinasyonunda ise daha uzun sürede gerçekleşmiştir. Başaklanma süresi Adana-99 çeşidinin yer aldığı melezlerde farklı vernalizasyon sürelerine göre 28 ve 30 günde olmuştur. Bu melez kombinasyonunda hasatlar 53 ve 55 günde yapılmıştır.

Nevzatbey çeşidinin bulunduğu melez kombinasyonu bir önceki generasyonda olduğu gibi en geç başaklanan kombinasyon olmuştur ve başaklanma süreleri farklı ekim zamanlarına göre 58 ve 59 günde tamamlanmıştır. Bu melez kombinasyonunun hasadı her iki vernalizasyon süresinde de 80 günde gerçekleştirilmiştir. Bu kombinasyon geç başaklanmasıyla dikkat çekmektedir. Bu melez kombinasyonunda başaklanma süresi diğer iki kombinasyona göre iki kat daha fazla sürede gerçekleşmiştir.

Rio Blanco × 127 melez kombinasyonunda bitkiler gebecik dönemine ekim zamanlarına göre 25 ve 29 günde ulaşırken, bitkilerin başaklanma süreleri 36 ve 37 günde tamamlanmıştır. Bu melez kombinasyonunda hasat işlemi her iki vernalizasyon zamanında da ekimden 60 gün sonra yapılmıştır. Bütün melez kombinasyonlar dikkate alındığında başaklanma ile çiçeklenme süresi arasında geçen süre, geriye melez kombinasyonlara göre değişmekle birlikte 2-5 gün arasında değiştiği görülmüştür.

GM₁F₂ generasyonundaki bitkilerin moleküler analizleri

GM₁F₂ generasyonundaki hatların PZR taramaları sonucunda hedef geni homozigot olarak taşıyan genotipler belirlenmiştir. Rio Blanco çeşidinin taşıdığı olduğu hasat öncesi başakta çimlenmeye dayanıklılık sağlayan gen kaynağı geriye melez yoluyla Nevzatbey, Adana-99 ve 127 çeşitlerine tekrarlanan ebeveyn olarak kullanıldığı geriye melez bitkilere aktarılmış ve bu işlem agaroz jelde genotiplerin 185 bç bölgesinde bant vermesiyle belirlenmiştir.

GM₁F₂ bitkileriyle gerçekleştirilen PZR işlemi sonucunda Rio Blanco × Nevzatbey melez kombinasyonlarında 8 adet, Rio Blanco × Adana-99 melez kombinasyonunda 10 adet ve Rio Blanco × 127 melez kombinasyonunda ise 9 adet homozigot hat belirlenerek toplam melez kombinasyonlarında başarılı gen aktarımı 27 adet genotipte gerçekleştirilmiştir. Yapılan moleküler analizlerinin sonuçları incelendiğinde hedef gen bakımından heterozigot durumdaki hatların varlığının devam ettiği de gözlenmiştir.

Hızlı ıslah teknolojisi dünyada 2018 yılında geliştirilen özgün ve ümitvar bir yöntemdir. Hızlı ıslah yöntemi üç uygulama ile ön plana çıkmaktadır. Bu uygulamalar; ışıklandırma süresinin uzatılması sonucu bitkilerin daha uzun süre fotosentez yapmasını sağlamak, çiçeklenmeden 15-20 gün sonra başaklar hala yeşil iken hasadın yapılması ve hasat edilip kurutulan tohumlardaki hasat sonrası dormansinin kırılması için tohumların soğukta tutulmasıdır (Ghosh ve ark., 2018; Watson ve ark., 2018). Hızlı ıslah teknolojisi yetiştirme süresinin kısaltılması yanında özellikle moleküler yöntemlerin kullanılması sonucunda gerek bitki ıslahı gerekse bilimsel araştırmaların yürütüleceği genetik materyallerin geliştirilmesinde önemli avantajlar sağlamaktadır. Örneğin, klasik ıslahta çok kullanılmayan inter-cross (melezler arası melezleme) özellikle genotiplerin moleküler olarak taranması sonucu hızlı ıslah yönteminde kullanılabilen ve hedef özellikleri taşıyan genotipler kısa sürede geliştirilebilmektedir.

Çalışma kapsamında markör destekli geriye melezleme yöntemi kullanılarak hasat öncesi başakta çimlenmeye dayanıklılık genleri taşıyan genotiplerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. GM₁F₁ ve GM₁F₂ generasyonları hızlı ıslah yöntemiyle yetiştirilmiş ve moleküler olarak hedef gen bakımından taranmıştır. GM₁F₁ generasyonunda hasat süresi 55 gün ile 71 gün arasında değişmiştir. En erken hasat edilen bitkiler yazlık çeşit olan Adana99 çeşidinin yer aldığı kombinasyondaki bitkilerdir. Yazlık çeşidin tekrarlanan ebeveyn olarak kullanılması sonucunda ihtiyaç duyulan vernalizasyon süresinin kısaltılması ve yetiştirme süresinin kısaltılması beklenen bir durumdur.

En geç hasat Nevzatbey çeşidinin bulunduğu melez kombinasyonunda 71 gün ile gerçekleşmiştir. 127 kodlu hattın yer aldığı melez kombinasyonunda ise yetiştirme süresi vernalizasyon sürelerine göre değişmek üzere 53 ile 80 gün arasında tamamlanmıştır. Nevzatbey çeşidi ve 127 kodlu hattın kışlık genotipler olması nedeniyle yetiştirme süresi uzamış olabilir. Çalışmada hızlı ıslah yöntemindeki bu yetiştirme süreleri bulguları, yöntemi geliştiren araştırmacıların sonuçlarıyla benzer olmuştur (Ghosh ve ark., 2018; Watson ve ark., 2018).

Araştırmada hedef, yetiştirme sürelerinin hızlı ıslah yöntemini kullanılarak kısaltılması olduğu için GM₁F₁ generasyonunda elde edilen bilgilere göre Adana-99 ve 127 kodlu genotiplerin yer aldığı melez kombinasyonların vernalizasyon süresi kısaltılırken, Nevzatbey çeşidinin yer aldığı melez



kombinasyonunun vernalizasyon süresi uzatılmıştır. Ayrıca vernalizasyon işlemi geniş spektrumlu LED lambalar kullanılan bitki büyütme kabiniinde gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucu olarak 127 kodlu genotipin hasat süresi aynı kalırken, vernalizasyon süresindeki 3-4 günlük bir kısalma toplam yetiştirme süresini de kısaltmıştır. Adana-99 çeşidinin yer aldığı melez kombinasyonunda hem vernalizasyon süresi 10 gün kısaltılmış hem de yetiştirme süresinde 2-3 günlük bir kısalma olduğu görülmüştür.

Nevezatbey çeşidinin tekrarlanan ebeveyn olduğu melez kombinasyonunda ise 54 güne kadar uzatılan vernalizasyon süresine rağmen yetiştirme süresi de 80 güne uzamıştır. Bu sonuç bu melez kombinasyonunun geççi bireylerden oluştuğunu göstermektedir. Zira çiçeklenme özelliği tahıllarda en karmaşık işleyen özellikler arasında yer almaktadır (Whittal ve ark., 2018).

Tahıllarda vernalizasyon çok allel ile kontrol edilen bir özellik olması nedeniyle özellikle sera şartlarında yürütülen geriye melez çalışmalarında araştırmacıların bitkilerin generatif döneme geçmesinde sorun yaşamamak ve özellikle moleküler olarak taranan tohumları kaybetmemek adına vernalizasyon süresinin belirlenmesinde çok dikkatli olmaları gerekmektedir. Zira her bir geriye melez kombinasyonunda farklı vernalizasyon gen kombinasyonlarının bir araya gelme ihtimali vernalizasyon süresinin tahmin edilmesini zorlaştırmaktadır. Bununla birlikte hızlı ıslah yönteminde yetiştirme süresinin kısaltılması adına kışlık buğdaylarda vernalizasyon süresinin kısaltılması da özgün araştırma konuları arasında yer almaktadır. Vernalizasyon süresinin kısaltılması yanında sağlıklı bir vernalizasyon işleminin gerçekleştirilmesi de önemlidir. Bu nedenle bu çalışmada moleküler olarak taranan tohumların vernalizasyon nedeniyle kaybedilmemesi adına vernalizasyon süreleri uzun tutulmuştur.

Sonuç

Hızlı ıslah yöntemine göre çiçeklenmeden 15-20 gün sonra tam olgunlaşmadan hasat edilen tohumların inkübatörde yedi gün süreyle kurutulması ve daha sonra 5-7 gün süreyle buzdolabında dormansilerinin kırılması amacıyla tutulması için geçirilen sürelerde dikkate alındığında araştırmada bir generasyon süresi 100-142 gün arasında değişmiştir. Yazlık buğdayda yapılan çalışmalarda bir generasyon süresinin 45-60 gün arasında değiştiği düşünüldüğünde kışlık buğday için bu sürelerin uygun olduğu düşünülebilir. Hasat öncesi başakta çimlenmeye dayanıklılık özellikle sahil bölgeleri için önemli bir özelliktir. Ayrıca iklim değişiklikleri nedeniyle bazı yıllarda iç bölgelerde de hasat dönemlerinde yoğun yağışlar gözlenebilmektedir. Gerçekleşmesi durumunda ekonomik olarak önemli kayıplara neden olan hasat öncesi başakta çimlenmeye karşı beyaz taneli bir genitörden dayanıklılık geninin beyaz taneli genotiplere markör destekli geriye melez seleksiyon yöntemiyle aktarılmış olması Türkiye ıslah programları için önemli bir kazançtır. Bilindiği üzere hasat öncesi başakta çimlenmeye tolerans ile tohum kabuğu arasında pleiotropik bir ilişki bulunmaktadır ve kırmızı taneli genotipler genel olarak hasat öncesi başakta çimlenmeye karşı daha toleranslıdır.

Çalışmada dünyada yeni geliştirilen hızlı ıslah teknolojisinin kullanılması araştırmanın özgün değerine katkı sağlamaktadır. Geliştirilen hatlar fenotipik olarak da test edildikten sonra gerek çeşit geliştirmek amacıyla gerekse hasat öncesi başakta çimlenmeye dayanıklı genitörler olarak kullanıma potansiyeline sahiptir. Bu çalışma ile Türkiye ıslah programlarına önemli bir genetik kaynak kazandırılmıştır.

Teşekkür: Bu araştırma, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü tarafından desteklenen 17 YL 18 numaralı proje kapsamında yürütülmüştür.

Kaynaklar

- Alahmad, S., Dinglasan, E., Leung, K.M., Riaz, A., Derbal, N., Voss-Fels, K.P., Hickey, L.T., 2018. Speed Breeding for Multiple Quantitative Traits in Durum Wheat. *Plant Methods*. 14(1): 36.
- Andrady, A., Aucamp, P.J., Bais, A., 2008. Environmental Effects of Ozone Depletion and Its Interactions with Climate Change. *Photochem Photobiol Sci*. 8: 13-22.
- Atak, M., 2017. Buğday ve Türkiye Buğday Köy Çeşitleri. *Journal of Agricultural Faculty of Mustafa Kemal University*. 2(22): 71-88.
- Baysal, Z., 2014. Aydın Ekolojik Koşullarında Çinko Uygulamasının Buğdayın (*Triticum aestivum* L.) Tane Verimi ve Kalitesi Üzerine Etkisi, Adnan Menderes Üniv., Fen Bilimleri Ens., Doktora Tezi, 120 s.
- Bewley, J.D., 1997. Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*. 9(7): 1055.



- Bewley, J.D., Black, M., 1994. Seeds. In Seeds, Springer. 1: 113.
- Brambilla, M., Mayor, J., Scridel, D., Anderle, M., Bogliani, G., Braunisch, V., Capelli, F., Cortesi, M., Horrenberger, N., Pedrini, P., Sangalli, B., Chamberlain, D., Arlettaz, R., Rubolini, D., 2018. Past and Future Impact of Climate Change Foraging Habitat Suitability in High-Alpine Bird Species: Management Options to Buffer Against Global Warming Effects. *Biological Conser.* 221: 209-218.
- Fakthongphan, J., Bai, G., Amand, P.S., Graybosch, R.A., Baenziger, P.S., 2016. Identification of Markers Linked to Genes for Sprouting Tolerance (Independent of Graincolor) in Hard White Winter Wheat (HWWW). *Theoretical and Applied Genetics.* 129(2): 419-430.
- Flintham, J.E., 1999. Seed Coat and Embryo Dormancy in Wheat. In 8th Int. Symp. on Pre-Harvest Sprouting in Cereals. 1: 67-76.
- Flintham, J.E., 2000. Different Genetic Components Control Coat-Imposed and Embryo-Imposed Dormancy In Wheat. *Seed Science Research.* 10(1): 43-50.
- Ghosh, S., Watson, A., Gonzalez-Navarro, O.E, Ramirez-Gonzalez, R.H., Yanes, L., Mendoza-Suárez, M., Hafeez, A., 2018. Speed Breeding in Growth Chamber Sand Glass Houses for Crop Breeding and Model Plant Research. *Nature protocols.* 13(12): 2944-2963.
- Graybosch, R.A., Stamand, P., Bai, G., 2013. Evaluation of Genetic Markers for Prediction of Pre-Harvest Sprouting Tolerance in Hard White Winter Wheats. *Plant Breeding.* 132(4): 359-366.
- Hickey, L.T., Dieters, M.J., DeLacy, I.H., Christopher, M.J., Kravchuk, O.Y., Banks, P.M., 2010. Screening for Grain Dormancy in Segregating Generations of Dormant× Non-Dormant Crosses In White-Grained Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica.* 172(2): 183-195.
- Kotlearachchi, N.S., Uchino, N., Kato, K., Miura, H., 2006. Increased Grain Dormancy in White-Grained Wheat by Introgression of Pre-Harvest Sprouting Tolerance QTLs. *Euphytica.* 152(3): 421-428.
- Kulwal, P.L., Kumar, N., Gaur, A., Khurana, P., Khurana, J.P., Tyagi, A.K., Gupta, P.K., 2005. Mapping of a Major QTL for Pre-Harvest Sprouting Tolerance on Chromosome 3A in Bread Wheat. *Theoretical and Applied Genetics.* 111(6): 1052-1059.
- Li, C., Ni, P., Francki, M., Hunter, A., Zhang, Y., Schibeci, D., Yu, J., 2004. Genes Controlling Seed Dormancy and Pre-Harvest Sprouting in Rice-Wheat-Barley Comparison. *Functional and Integrative Genomics.* 4(2): 84-93.
- Liu, S., Cai, S., Graybosch, R., Chen, C., Bai, G., 2008. Quantitative Trait Loci For Resistance to Pre-Harvest Sprouting in us Hard White Winter Wheat Rio Blanco. *Theoretical and Applied Genetics.* 117(5): 691-699.
- Mares, D., Mares, D., Mrva, K., Cheong, J., Williams, K., Watson, B., Storlie, E., Sutherland, M., Zou, Y., 2005. "A QTL Located on Chromosome 4A Associated With Dormancy in White and Red-Grained Wheats of Diverse Origin." *Theoretical ve Applied Genetics.* 111(7): 1357-1364.
- Morris, C.F., Paulsen, G.L., 1992. Research on Pre-Harvest Sprouting Resistance in Hard Red and White Winter Wheats at Kansas State University. *Pre-Harvest Sprouting in Cereals, Crop Sci.* 3: 113-120.
- Öktem, T.G., Soylu, S., Sürek, H.H., 2020. Tahıl Üretimimizin Mevcut Durumu ve Geleceği. *Türkiye Ziraat Mühendisliği IX. Teknik Kongresi.* 1: 371.
- Peng, J., Richards, D.E., Hartley, N.M., 1999. 'Green Revolution' Genes Encode Mutant Gibberellin Response Modulators. *Nature.* 400: 256-261.
- Rasul, G., Humphreys, G.D., Wu, J., Brulé-Babel, A., Fofana, B., Glover, K.D., 2012. Evaluation of Pre-Harvest Sprouting Traits in a Collection of Spring Wheat Germplasm Using Genotype and Genotype× Environment Interaction Model. *Plant Breeding.* 131(2): 244-251.
- Riaz, A., Periyannan, S., Aitken, E., Hickey, L., 2016. A Rapid Phenotyping Method for Adult Plant Resistance to Leaf Rust in Wheat. *Plant Methods.* 12(1): 17.
- Thomason, W.E., Hughes, K.R., Griff, C.A., Parrish, D.J., Barbeau, W.E., 2019. Understanding Pre-Harvest Sprouting of Wheat. *Virginia Tech.* 424: 1-4.
- Vetch, J.M., Stougaard, R.N., Martin, J.M., Giroux, M.J., 2019. Revealing the Genetic Mechanisms of Pre-Harvest Sprouting in hexaploid Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci.* 281: 180-185.
- Vleeshouwers, L.M., Bouwmeester, H.J., Karssen, C.M., 1995. Redefining Seed Dormancy: an Attempt to Integrate Physiology and Ecology. *Journal of Ecology.* 6: 1031-1037.
- Watson, A., Ghosh, S., Williams, M.J., Cuddy, W.S., Simmonds, J., Rey, M.D., Adamski, N.M., 2018. Speed Breeding is a Powerful Tool to Accelerate Crop Research and Breeding. *Nature Plants.* 4(1): 2329.
- Whittal, A., Kaviani, M., Graf, R., Humphreys, G., Navabi, A., 2018. Allelic variation of vernalization ve photoperiod response genes in a diverse set of North American high latitude winter wheat genotypes. *PLoS One.* 13(12).
- Yıldırım, A., Kandemir, N., 2001. Genetik Markörler ve Analiz Metotları. *Bitki Biyoteknolojisi II. Bölüm,* 23: 334-363.