

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ ORTAK PROGRAMI

**NOHUT ANTRAKNOZU (*Ascochyta rabiei*) HASTALIĞINA KARŞI DİRENÇ
GENLERİNİN BELİRLENMESİ ve ÖZGÜL BELİRTEÇLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURCU YANIK

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. İSMAİL POYRAZ

BİLECİK, 2020
REFERANS NUMARASI: 10358638

T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ ORTAK PROGRAMI

**NOHUT ANTRAKNOZU (*Ascochyta rabiei*) HASTALIĞINA KARŞI DİRENÇ
GENLERİNİN BELİRLENMESİ ve ÖZGÜL BELİRTEÇLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURCU YANIK

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. İSMAİL POYRAZ

BİLECİK, 2020
REFERANS NUMARASI: 10358638

T.C.
BILECIK SEYH EDEBALI UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF SCIENCES
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS
ANADOLU UNIVERSITY JOINT PROGRAM

**DETERMINATION of RESISTANCE GENES AGAINST ANTHRACNOSE DISEASE
(*Ascochyta rabiei*) and DEVELOPING of SPECIFIC MARKERS**

MASTER'S THESIS

BURCU YANIK

THESIS ADVISOR
ASSOC. PROF. DR. ISMAIL POYRAZ

BILECIK, 2020
REFERENCE NUMBER: 10358638

BEYAN

‘Nohut Antraknozu (*Ascochyta Rabiei*) Hastalığına Karşı Direnç Genlerinin Belirlenmesi Ve Özgül Belirteçlerin Geliştirilmesi’ adlı yüksek lisans yeterlik tezi hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel ahlak kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Bu çalışmam, Bilimsel Araştırmalar Projeleri (BAP), TÜBİTAK veya benzeri kuruluşlarca desteklenmesi durumunda; projenin ve destekleyen kurumun adı proje numarası ile birlikte beyan edilmelidir.			
DESTEK ALINMIŞTIR		DESTEK ALINMAMIŞTIR	
Destek alındı ise;			
Destekleyen Kurum:			
Desteğin Türü		Proje Numarası	
1- BAP (Bilimsel Araştırma Projesi)			
2- TÜBİTAK			
Diğer;			

Burcu YANIK

30/09/ 2020

İMZA

ÖN SÖZ

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca, tez çalışmasının planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen,engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, çalışmanın her aşamasında daimi yol gösteren, çalışmamın laboratuvar aşamasında karşılaştığım güçlüklerde sabırlı ve sevecen yaklaşımıyla yardımlarını esirgemeyerek değerli fikirlerini paylaşan, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren ve yanımda olan değerli hocam Doç. Dr. İsmail POYRAZ'a en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Yine çalışma sırasında bana destek veren tüm Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü ekibine teşekkür ederim.

Her zaman en büyük desteği veren sevgili annem Beyhan YANIK ve babam Vahdettin YANIK'a teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, bana destek veren, biricik dostlarım Ayşenur BUDAK, Canan DEMİRCİ, Büşra SEVİM, Beyza ANDİÇ, Şule ÜNLÜ'ye sonsuz teşekkürler ederim.

Burcu YANIK

30/09/ 2020

ÖZET

NOHUT ANTRAKNOZU (*Ascochyta rabiei*) HASTALIĞINA KARŞI DİRENÇ GENLERİNİN BELİRLENMESİ ve ÖZGÜL BELİRTEÇLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Dünya üzerinde oluşan çevre sorunları, üretim azlığı, hayvansal ürünlerin maliyetli olması vb. durumlardan dolayı bitkisel kaynaklı protein ihtiyacı çoğalmıştır. Bu ihtiyacı karşılamak için, içerdiği protein, vitamin, mineral ve aminoasit miktarı fazla olması nedeniyle tane baklagillerin kuru taneleri kullanımı tercih edilmektedir. Nohut, Dünya’da fasulye, soya fasulyesi ve bezelyeden sonra en çok tercih edilen dördüncü en önemli tahıl baklagilidir. Nohut bitkisi, *Ascochyta rabiei* (Pass) Lab.'ın neden olduğu *Ascochyta* yanıklığına duyarlıdır. Bu en yıkıcı nohut hastalığıdır. Hastalık, bitkinin tüm hava kısımlarını etkiler, gövdeler, deriler, baklalar ve tohumlarda nekrotik lezyonlara neden olur. Patojen için uygun koşullar olduğunda %100 varan kayıplara neden olabilmektedir. Bu çalışmada, ilk aşamada NCBI (National Center for Biotechnology Information Search database) veri tabanı ve literatür araştırma verileri kullanılarak, antraknoz yanıklığına karşı tanımlanmış direnç genleri ve dizi bilgileri elde edilmiştir. NCBI-Genome Data Viewer ile intron içermediği teyit edilen dizi bilgileri, MEGA 10.1.8 programında ClustalW ile hizalanmış ve Maximum Parsimony yöntemiyle genlerin benzerlik dendrogramı çizilmiştir. Dendrogramda belirlenen gen gruplarının her biri kendi içine ayrı hizalanarak, her gruba özgül yüksek oranda korunmuş özgül belirteçler tasarlanmıştır. Tasarlanan markörler, Eskişehir Geçit Kuşağı tarımsal araştırma enstitüsünden elde edilen otuz sekiz çeşit ve melez nohuttan ticari kit ile izole edilen DNA örneklerinin kalıp olarak kullanıldığı PZR yöntemiyle test edilmiştir. Agaroz jelde PZR ürün büyüklüklerine göre direnç genlerinin varlık/yokluk analizi gerçekleştirilmiştir. Nohut örneklerinin tarladaki dayanıklılık durumları ile özgül belirteç verileri karşılaştırılmış ve antraknoz hastalığına karşı mücadelede dayanıklı bireylerin tespitine yönelik çalışmalarda kullanılabilirliği analiz edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Nohut, Antraknoz hastalığı, NBS-LRR direnç genleri, Özgül markörler.

ABSTRACT

DEVELOPMENT of SPECIAL MARKERS and DETERMINATION of RESISTANCE GENES AGAINST CHICKPEA ANTHRACNOSIS (*Ascochyta rabiei*) DISEASE

Environmental problems occurring in the world, lack of production, cost of animal products etc. Due to situations, the need for vegetable origin has increased. In order to meet this need, it is preferred to use dry grains of grain legumes due to the high amount of protein, vitamins, minerals and amino acids. Chickpeas are the fourth most preferred grain legumes in the world after beans, soybeans and peas. Chickpea is susceptible to ascochyta blight caused by *Ascochyta rabiei* (Pass) Lab. This is the most devastating chickpea disease. The disease affects all the air parts of the plant, causing necrotic lesions in stems, skins, broad beans and seeds. Fracture of stems and leaf stems is also an important symptom. In the area, infected plants are often seen as spots that reflect foci where the pathogen spreads. These spots are irregularly sized, ranging from light brown to blackish dark brown and are surrounded by the yellow circle. It can cause losses of up to 100% when favorable conditions occur for the pathogen. In order to spread the disease, it is sufficient to have a presence in the region raised. In our country, quite a lot of losses are given against *Ascochyta rabiei* pathogen. In our study, the localization of the sequences that may be resistant to anthracnose blight resistances genes (NBS-LRR gene family), and specific markers were designed using nucleotide sequences. Through the designed markers, the presence or absence of sequences that may be resistance genes in the genomes of the thirty-eight varieties / hybrid chickpeas obtained from the Eskişehir Crossing Agricultural Research Institute. As a result of the data we obtained, it is aimed to increase the studies on the use of beaten individuals in the fight against Chickpeas Anthracnose blight.

Keywords: Chickpea, Anthracnose disease, NBS-LRR resistance genes, Specific markers.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖN SÖZ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Nohut (<i>Cicer arietinum</i> L.) Bitkisinin Taksonimisi ve Yayılışı	5
1.2. Nohut Bitkisinin Genom Yapısı, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri	9
1.3. Nohut Bitkisinin Önemi	11
1.4. Antraknoz Hastalığı (<i>Ascochyta rabiei</i>) Etmeninin Tanımı ve Yaşayışı	12
1.5. Hastalığın Belirtileri, Yayılışı ve Ekonomik Önemi	13
1.6. Konukçuları	17
1.7. Hastalıkla Mücadele	18
1.8. Antraknoz Hastalığına Karşı Direnç Genleri	20
2. MATERYAL ve METOD.....	24
2.1. Bitki Materyali	24
2.2. DNA İzolasyonu	26
2.3. Özgül Belirteç (Marker) Tasarımı	27
2.4. PZR Yöntemiyle Çoğaltım.....	30
2.5. Agaroz Jel Elektroforezi ve Fotoğraflama	32
3. BULGULAR	33
3.1. DNA Miktar ve Kaliteleri	33
3.2. Gen Dizilerinin Benzerlik Analizi	34
3.3. PZR Ürünlerinin Analizi	35
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	42
5. KAYNAKÇA.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	40

TABLÖLER LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1. Nohut (<i>Cicer arietinum</i> L.) bitkisinin sistematik sınıflandırması.....	5
Tablo 1.2. 2012-14 yılları arasında büyük üretici ülkelerde nohutta hasat edilen ortalama üretim, verim ve alan.....	6
Tablo 1.3. Nohut bakliyatlarının besin profili (taze ağırlık temelinde 100 g yenilebilir kısım başına).....	8
Tablo 1.4. Bakliyatların mikrobeyin profili (taze ağırlık temelinde 100 g yenilebilir kısım başına).....	9
Tablo 1.5. <i>Ascochyta rabiei</i> adlı patojenin taksonomik sınıflandırması.....	13
Tablo 2.1. Örnek alınan 38 çeşit/melez bitki materyali	25
Tablo 2.2. Tasarlanan özgül primerler ve nükleotid dizileri	29
Tablo 2.3. 38 nohut çeşidi için hazırlanan 25µl PZR MİX protokolü	31
Tablo 2.4. TBE tampon içeriği	32
Tablo 3.1. Nohut çeşitlerinden izole edilmiş genomik DNA'ların miktar ve saflık ölçüm sonuçları.....	33
Tablo 4.1. Tasarlanan ve kullanılan 14 adet moleküler belirteçler ile 38 Çeşit/Hat Nohut üzerinde yapılan PZR yöntemiyle çoğaltım sonucu jel görüntülerine bakılarak R-genleri varlık-yokluk tespiti (+: varlık, -: yokluk).....	45

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Türkiye’deki Nohut havzaları harita görüntüsü	8
Şekil 1.2. Nohut fidesi durumu	9
Şekil 1.3. Nohut antraknozu hastalığının a) Sap ve dallarda oluşturduğu belirti b) Nohut yapraklarında oluşturduğu çevresi sarı renkli kahverengi lekeler.....	14
Şekil 1.4. Nohut antraknozu hastalığının a) Nohut Kapsülünde oluşturduğu belirti. b) Nohut danesindeki belirtisi.....	14
Şekil 1.5. <i>Ascochyta</i> yanıklığının tohumdaki semptomları.....	14
Şekil 1.6. <i>Ascochyta rabiei</i> adlı mantar patojeninin hayat döngüsü	16
Şekil 1.7. <i>Ascochyta rabiei</i> ’nin eşeyli ve eşeysiz üremesi sırasındaki sporlarının mikroskop görüntüleri a) Peritesyumdan Çıkan Askosporları b) Etmenin PDA(Patates dekstroza agar)’da gelişimi c) Askus ve Askosporları d) Pikniosporları(Konidileri)	16
Şekil 1.8. Nohut antraknoz hastalığının a,b; nohut yapraklarında, c,d; nohut sapındaki belirtileri.....	18
Şekil 2.1. Eskişehir Geçitkuşığı tarımsal araştırma enstitüsü Nohut çeşit/melez tarla görüntüsü	24
Şekil 2.2. Loc101515491’nin NCBI veri analizi sonucu elde edilen Ca_10064 NBS-LRR protein gene, complete cds bilgileri ekran görüntüsü.....	28
Şekil 2.3. Loc101488696’nin NCBI veri analizi sonucu elde edilen Ca_10065 NBS-LRR protein gene, complete cds bilgileri ekran görüntüsü.....	30
Şekil 2.4. 100bp DNA ladder marker	32
Şekil 3.1. NCBI gen bankası veri tabanında antraknoz direnci için tanımlanan genlerin dizi benzerliklerine göre dendogramı (At3g14460 Gene ID: 101511364, Gene ID: 101514528, Gene ID: 101504401, Gene ID: 101504943, Gene ID: 101504229, Gene ID: 101505696. CC-NBS-LRR Gene ID: 101492550. At1g50180 Gene ID: 101497121. At4g27190-like Gene ID: 101496761. At5g05400 Gene ID: 101497997, Gene ID: 101506740. LAZ5 Gene ID: 101499439, Gene ID: 101499941. RGA1 Gene ID: 101494964, RGA2 Gene ID: 101498365, RGA3 Gene ID: 101496073, Gene ID: 101495199. RGA4 GeneID: 101489480, GeneID: 101490582. RML1A GeneID: 101503346. RML1A-like GeneID: 101498509. RPM1 GeneID: 101492653, GeneID: 101497442, GeneID: 101505222, GeneID: 101504665, GeneID: 101497108. RPM1-like GeneID: 101493526. RPP2B-like GeneID: 101505313. RPS2-like GeneID: 101512529. RPP8_like GeneID: 101512690. RPP13_like GeneID: 101494471, GeneID: 101497042, GeneID: 101500214, GeneID: 101501665, GeneID: 101502658, GeneID: 101515540, GeneID: 101495647. ENHANCED DISEASE RESISTANCE 2 GeneID: 101490237. probable_At4g27220 GeneID: 101493495, GeneID: 105851576. At4g33300 GeneID: 101492877,probable_At5g66900 GeneID: 101505949..).....	34
Şekil 3.2. At3g/RPP13-like primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M:Markör.....	35

Şekil 3.3. At4g27190_like primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M:Markör	35
Şekil 3.4. At5g05400 primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M:Markör.....	36
Şekil 3.5. Laz5 primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M:Markör	36
Şekil 3.6. CC-NBS-LRR primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M:Markör	37
Şekil 3.7. RGA 1 primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M:Markör	37
Şekil 3.8. RGA 2 primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M:Markör	38
Şekil 3.9. RGA 3 primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M:Markör	38
Şekil 3.10. RGA 4 primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M:Markör	39
Şekil 3.11. RML1A primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M:Markör	39
Şekil 3.12. RPP2B primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M:Markör.....	40
Şekil 3.13. RPP13 Lİke-1 primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M:Markör	40
Şekil 3.14. RPM1 primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M:Markör	41
Şekil 3.15. RPS2 primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M:Markör	41

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

UV: Ultra viyole

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

DNA: Deoksiriboz Nükleik Asit

SSR: Simple Sequence Repeat

FAO: Food and agriculture organization

CTAB: Hekzadesil trimetil amonyum bromit

TBE: Tris Borate EDTA

EDTA: Etilen daimin tetra asetik asit

ml: mililitre

µl: mikrolitre

PDA: Patates dekstroza agar

NCBI: National Center for Biotechnology Information Search database

1. GİRİŞ

Dünya üzerinde oluşan çevre sorunları, üretim azlığı ve hızlı nüfus artışına bağlı olarak açlık çeken insan sayısı hızla artmaktadır. Hayvansal ürünlerin maliyetli olması nedeniyle de bitkisel kaynaklı protein ihtiyacı çoğalmıştır. Bu ihtiyacı karşılamak için içerdiği protein, vitamin, mineral ve aminoasit miktarı fazla olması nedeniyle tane baklagillerin kuru tanelerinin kullanımı tercih edilmektedir (Bayrak, 2010: 1).

Nohut (*Cicer arietinum L.*), dünyanın en önemli tahıl baklagillerinden biridir ve tohumu insanlar için bitki-bazlı diyet proteininin ana kaynağıdır (Gan vd., 2006: 122). Ülkemizde de nohut bazlı proteine ilgi fazladır ve çeşitli bölgelerde üretilmektedir. Bu üretilen nohutlardaki protein miktarı oranı çeşit özelliğine, yetiştirildiği çevrenin koşullarına ve uygulanan yetiştirme yöntemlerine göre değişmektedir (Atasagun, 2009: 3).

Nohut; Güney Asya, Batı Asya, Kuzey Afrika, Doğu Afrika, Güney Avrupa, Kuzey ve Güney Amerika ve Avustralya başta olmak üzere en az 33 ülkede yetiştirilen dünyanın en önemli ikinci ürünüdür (Singh, 1997: 161).

Nohut (*Cicer arietinum L.*) kuru fasulye ve bezelye sonrası üretim açısından üçüncü en önemli nabızdır. Üreme amaçları için bu tür sıklıkla iki ana türe ayrılır: desi ve kabuli. Desi türleri çoğunlukla küçük ve koyu renkli tohumlara sahipken, kabuli tiplerinin tohumları daha büyük ve krem rengindedir. Kabuli türü Akdeniz havzası, Yakın Doğu, Orta Asya ve Amerika'da insan tüketimi için tercih edilirken desi türleri Güney Asya ve Doğu Afrika'da yaygın olarak ekilir (Iruela vd., 2006: 278).

Birçok nohut üreten ülkede nohutun potansiyel ve gerçek verimleri arasında büyük farklar vardır. Bu verim farklılıkları çeşitli biyotik ve abiyotik streslerden kaynaklanmaktadır. Potansiyel küresel nohut üretiminde yıllık 6.4 milyon ton açığı abiyotik streslere ve yaklaşık 4.8 milyon ton açık ise biyotik streslere bağlıdır. Kuraklık ve ısının, potansiyelden daha az nohut verimi için hava ile ilgili en önemli nedenler olduğu düşünülmektedir. Vejetatif faz sırasında dondurma, üreme fazı sırasında 10 ° C'nin altında soğutma, tuzluluk, alkalinite, su bolluğu ve besin eksiklikleri, dünya genelinde nohut verimini etkileyen diğer önemli abiyotik faktörlerdir. Biyotik stresler arasında en büyük hasar *Helicoverpa*, *Ascochyta* yanıklığı ve *Fusarium* solgunluğu gibi zararlılardan ve hastalıklardan kaynaklanmaktadır. Herbisitlere karşı düşük direnç seviyeleri nedeniyle, nohut bitkisi ortaya çıktıktan sonra yabancı otların kimyasal yollarla kontrol edilmesi önerilmez. Bu nedenle, el ile ayıklama geliştirmekte olan

ülkelerde, büyük çiftlik büyüklüklerine sahip gelişmiş ülkelerde, kimyasal herbisitlerin ekimi, ekimden önce veya ekimden hemen sonra geçen süre ile sınırlıdır. Yabancı otların yüzde 23 ila 87 arasında verim kaybı ile sonuçlandığı tahmin edilmektedir (FAO,2014: 23).

Her iki nohut türü, *Ascochyta rabiei* (Pass) Lab'in neden olduğu ascochyta yanıklığına duyarlıdır. Bu en yıkıcı nohut hastalığıdır ve patojen için uygun koşullar altında mahsulün tamamen kaybına neden olabilir. Başlangıçta mantar birincil ve ikincil menşe merkezlerine bağlanmış olabilir, ancak enfekte nohut germplazmasının hareketi ile dünya çapında yayılmıştır. Hastalık, bitkinin tüm hava kısımlarını etkiler, gövdeler, deriler, baklalar ve tohumlarda nekrotik lezyonlara neden olur. Sapların ve yaprak saplarının kırılması da önemli bir semptomdur. Alanda, enfekte olmuş bitkiler genellikle patojenin yayıldığı odakları yansıtan yamalar olarak görülür. Mantarın çeşitli patotipleri tanımlanmıştır ve aynı izolat içindeki patojenite veya agresiflik çevresel koşullara göre değişebilir. Kültürel uygulamaların kullanımı, patojenlerin bölge popülasyonlarının izlenmesi, tohum tedavileri, fungusitin yaprak spreyleri ve dirençli veya toleranslı çeşitlerin kullanımı dahil olmak üzere entegre bir yönetim yaklaşımı, genellikle *Ascochyta* nohut yanıklığını kontrol etmek için uygulanır. *Ascochyta* yanıklığına karşı direnç kaynakları tanımlanmış ve yanmaya karşı dayanıklılık için nohut yetiştiriciliği nohut iyileştirme programlarının önemli bir hedefi haline gelmiştir. Yanıklığa dayanıklı germplazmanın geliştirilmesi, Akdeniz havzasında kışlık nohut ekiminin, önemli ölçüde artan verim olasılığı ile tanıtımına izin vermiştir (Iruela vd., 2006: 278-279).

Çeşitli patojenlerle başa çıkmak için bitkiler de bir bağışıklık sistemi geliştirmiştir. Bitki bağışıklık sistemi adaptif bağışıklık sistemini olmadığı için omurgalı hayvanlardan farklıdır. Bitkiler patojenleri algılamak ve bunlara yanıt vermek için sadece iki katmanlı hücre-otonom bağışıklık sistemine güvenebilir. Çoğu patojen enfeksiyonu konakçı olmayan direnç; plazma zarı üzerinde lokalize olan bitki deseni tanıma reseptörleri (PRR'ler) tarafından patojene bağlı moleküler modellerin (PAMP'ler) tanınmasıyla aktif olan bitki bazal savunma tepkisinin birinci tabakası tarafından verilerek gerçekleştirilir. Bazı özel patojenler ise, konakçı bazal savunmayı baskılamak için efektör proteinleri bitki hücrelerine ileterek ilk bariyeri atlatabilir. Bu tür patojenler, patojen efektör proteinin varlığını tanıyan ve akış aşağıyı aktive eden bitki hastalığına direnç geni (R-genleri) tarafından kodlanan hücre içi reseptörlerin aracılık ettiği efektörle tetiklenen bağışıklık (ETI) mekanizması olan ikinci savunma tabakası ile karşılanır (Mandeep vd., 2017: 2).

Bitki de bulunan protein alanı organizasyonlarına ve bitki hücresindeki lokalizasyonlarına göre çeşitli R-gen sınıfları tanımlanmış ve sınıflandırılmıştır. Merkezi Nükleotid Bağlanma Bölgesi (NBS) ve karboksil / C-terminal Lösin Zengin Tekrar (LRR) bölgesinden oluşan kodlama proteinleri R-gen sınıfını en fazla içerenlerdir ve NBS-LRR genleri olarak isimlendirilir. Bitki NBS-LRR patojen efektör varlığını algılayabilen hücre içi reseptörlerdir. Proteinleri patojen efektör proteinlerine bağlanarak veya konakçıdaki patojen efektör hedef proteinlerinde herhangi bir değişikliği tanıyarak dolaylı olarak işlev alır. Patojen büyümesini sınırlayan diğer biyokimyasal değişiklikler de savunma mekanizmasında görev alır. Böylelikle aşırı duyarlı tepkiyle sonuçlanan çoklu savunma sinyali transdüksiyonlarını aktive eder. Merkezi NBS alanı (NB-ARC alanı), ATP ve GTP fosforillenmesi ve defosforillenmesi için gerekli olan sıralı korunmuş motiflerden oluşur. Bitki NBS domaini ve hayvan hücre apoptozunda yer alan Apaf-1 ve CED4 alanları arasında aktiviteleri bakımından benzer olan yapısal homoloji gösterir. NBS bölgesinden sonra birkaç ardışık LRR bölgesi patojen efektör moleküllerine karşı tanıma spesifikliği sağladığı bilinmektedir (Mandeep vd., 2017: 2).

Bitki NBS-LRR genleri, amino / N-terminal alanının varlığı veya yokluğuyla ilişkili olarak iki alt sınıfa ayrılabilir. Birinci alt sınıf, N-terminal konumunda *Drosophila* Toll ve INTERLEUKIN1 benzeri reseptör (TIR) alanını kapsar ve TIR-NBS-LRR (TNL) proteinlerini içerir. Diğer alt sınıf ise Coiled-coil (CC) alanını kapsar ve CC-NBS-LRR(CNL) proteinlerini içerir. Zinc Finger veya RPW8 alanı gibi diğer alanlar da CNL sınıfı altında sınıflandırılan CC alanı yerine N-terminal konumunda bulunur (Mandeep vd., 2017: 2).

Ascochyta yanıklığına karşı genetik direnç karmaşık bir özelliktir ve çevresel koşullardan oldukça etkilenir. Bugüne kadar, bağlantı grupları (LG'ler) 2, 3, 4, 6 ve 8'deki çeşitli genetik arka planlarda, *Ascochyta* yanıklığı direnci için birkaç niceliksel özellik lokusu (QTL) tanımlanmıştır. Bu Q TL'lerin çoğu SSR işaretleri ile etiketlenmiştir. Direncin altında yatan genler hala bilinmiyor. Şimdiye kadar etilen yolağından iki aday gen CaETR-1 (EIN-4 benzeri) ve etilen duyarsız 3-benzeri gen (Ein3), LG4 üzerindeki *Ascochyta* yanma direnci QTLAR1 ve LG2'deki QTLAR3'te tanımlanmıştır. Bu çalışmalar, etilen yolunun nohutta *ascochyta* yanma direncine olası katılımını önermektedir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, *Ascochyta rabiei* enfeksiyonuna yanıt olarak savunma ile ilgili 15 genin ekspresyon profili, on nohut genotipi arasında altı farklı eksprese edilmiş gen tespit edilmiştir. *Ascochyta* yanıklığı ile ilişkili Q TL'lere direnç gösteren aday genlerin belirlenmesi, direnç

mekanizmasının anlaşılmasına yardımcı olacak ve marker destekli seçim kullanılarak dirençli çeşitlerin geliştirilmesine yardımcı olacaktır (Mandeep ve ark., 2017: 2).

Bugün için hastalıklarla savaşın en kesin ve uygun yolu dayanıklı çeşitler geliştirilerek bunların üretilmesidir. Çeşit ıslahında yüksek verim, yüksek kalite, kısa ve kurağa ve hastalıklara karşı dayanıklılık önemlidir. Bu nedenle yeni dayanıklı çeşitler geliştirilmeli veya yüksek verimli mevcut çeşitlere dayanıklılık genleri aktarılmalıdır (Furan ve ark. 2009: 1).

Kalıtım şekilleri, morfolojik, biyokimyasal ve DNA düzeyinde izlenebilen karakterlere genetik markörler denir. Bunların markör olarak isimlendirilmesinin sebebi, incelenen organizmadaki ilgilenen diğer özellikleri hakkında dolaylıda olsa bilgi sağlamalarıdır. Moleküler markörler DNA'nın aktif bölgeleri olan genlerden veya kodlama fonksiyonu bulunmayan DNA dizilerinden geliştirilebilir. Moleküler DNA markörlerinin bitki ıslahına entegrasyonu, arzulanan genlerin çeşitler veya türler arasındaki hareketinin hızlandırmasının yanı sıra akraba yabancı türlerden yeni genlerin aktarılmasına izin vermiş ve çok gen tarafından idare edilen karmaşık karakterlerin incelenmesini mümkün kılmıştır. Ayrıca genlerin klonlanmasını kolaylaştırmış ve birbiriyle çaprazlanmayan bitkiler arasındaki genetik ilişkiyi açığa çıkarmıştır (Yıldırım A., 2001: 2).

SCAR belirteçleri lokus spesifiktirler ve farklı genetik arka planlarda tanımlanabilirler, böylece bireylerin ayrışma popülasyonlarında yanlış sınıflandırma şansını azaltırlar (Iruela ve vd., 2006: 279).

Bu çalışmada, ilk aşamada NCBI (National Center for Biotechnology Information Search database) veri tabanı ve literatür araştırma verileri kullanılarak, antraknoz yanıklığına karşı tanımlanmış direnç genleri ve dizi bilgileri elde edilmiştir. NCBI-Genome Data Viewer ile intron içermediği teyit edilen dizi bilgileri, MEGA 10.1.8 programında ClustalW ile hizalanmış ve Maximum Parsimony yöntemiyle genlerin benzerlik dendrogramı çizilmiştir. Dendrogramda belirlenen gen gruplarının her biri kendi içine ayrı hizalanarak, her gruba özgül yüksek oranda korunmuş özgül belirteçler tasarlanmıştır. Tasarlanan markörler, Eskişehir Geçit Kuşağı tarımsal araştırma enstitüsünden elde edilen otuz sekiz çeşit ve melez nohuttan ticari kit ile izole edilen DNA örneklerinin kalıp olarak kullanıldığı PZR yöntemiyle test edilmiştir. Agaroz jelde PZR ürün büyüklüklerine göre direnç genlerinin varlık/yokluk analizi gerçekleştirilmiştir. Nohut örneklerinin tarladaki dayanıklılık durumları ile özgül markör verileri karşılaştırılmış ve antraknoz hastalığına karşı mücadelede dayaklı bireylerin tespitine yönelik çalışmalarda kullanılabilirliği analiz edilmiştir.

1.1 Nohut (*Cicer arietinum* L.) Bitkisinin Taksonomisi ve Yayılışı

Kültür nohutu (*Cicer arietinum* L.) eski dünyada kültüre alınan ilk tahıl baklagillerinden biridir. Büyük olasılıkla Suriye'ye bitişik bölgelerden ve Türkiye'nin güneydoğu bölgelerinden köken almaktadır. Ladizinsky ve Adler, tohum-protein elektroforezine dayanarak kültür nohutunun yabani atası olarak *C. Reticulatum*'u ve mahsülün merkezini de Türkiye'nin güneydoğusundan köken aldığını belirtmiştir. Nohutun yabani atası üzerinde hala tartışmalar olsa da, yapılan karyotip, hibridizasyon ve izoenzim örnek çalışmaları Ladizinsky ve Adler'in nohutun kökeni hakkındaki bulgularını desteklemektedir. Daha önce botanikçiler birkaç farklı köken öne sürmüşlerdi. De Candolle, nohutun kökenini Kafkasya'nın güneyine ve İran'ın kuzeyine dayandırmıştır. Vavilov, güneybatı Asya ve Akdeniz olmak üzere birinci iki ana merkez ve Etiyopya'dan köken alan ikinci bir merkez olarak belirlemiştir. Küçük tohumlu hatlar doğuya doğru baskınken, büyük tohumlu hatlar Akdeniz havzası çevresinde not etti. Büyük tohumlu nohutun Afgan başkenti Kabil üzerinden yaklaşık iki yüzyıl önce Hindistan'a ulaştığına ve Hintçe'de Kabuli chana (chana = nohut) olarak bir isim edindiğine dair dilbilimsel kanıtlar bulunmaktadır. Küçük tohumlu koyu nohut desi (lokal) olarak adlandırılır ve bu mezhepler yaygın olarak iki ana çeşit grubu ayırt etmek için kullanılır. Küçük tohumlu nohutun ilk önce seçim ve mutasyon ile geliştirilen büyük tohumlu tiplerle yönlendirildiği neredeyse kesindir. Yerel gıda tercihleri bu türlerin farklı bölgelerde yayılmasına ve adaptasyonuna yardımcı olmuştur (Singh, 1997: 162).

Tablo 1.1. Nohut (*Cicer arietinum* L.) bitkisinin sistematik sınıflandırması.

Kingdom	Plantae
Subkingdom	Tracheobionta
Phylum	Magnoliophyta
Class	Magnoliopsida
Subclass	Rosidae
Order	Fabales
Family	Fabaceae
Genus	Cicer
Species	<i>Cicer arietinum</i> L.

Kaynak: (Tabanlı, 2016: 2)

Nohut (*Cicer arietinum* L.) bitkisi Fabaceae ailesinin bir üyesidir. 33 çok yıllık, 9 tek yıllık ve 1 adet de taksonandırılmamış olmak üzere toplam 43 türü içermektedir. Tek yıllık bitki türleri bazı morfolojik özellikleri, yetiştirildiği bölge ve yaşam döngüleri gibi özelliklerine bakılarak Monocicer ve chamacicer olarak ikiye ayrılmaktadır. Monocicer grubunun içerisinde 8 tane tek yıllık nohut türü (*Cicer arietinum* L., *C. bijugum* L., *C.*

cuneatum L., *C. echinospermum* L., *C. judaicum* L., *C. pinnatifidum* L., *C. reticulatum* L. ve *C. yamashitae* L.) bulunmaktadır. Chamacicer grubunda ise *C. chorassanicum* L. türü bulunmaktadır. Çok yıllık nohut türlerini içeren Polycicer ve Acanthocicer adlı iki grup bulunmaktadır. Polycicer adlı grupta 25 adet, Acanthocicer adlı grupta ise 7 adet çok yıllık nohut türü vardır. Burada bahsedilen bütün gruplar ve onların barındırdıkları türler arasında ticari ve ekonomik öneme olan tek tür kültür nohutu da denilen *C. arietinum* L. türüdür (Tabanlı, 2016: 2).

Tablo 1.2. 2012-14 yılları arasında büyük üretici ülkelerde nohutta hasat edilen ortalama üretim, verim ve alan.

Ülkeler	Üretilen (milyon ton)	Verim (hektar başına kilogram)	Hasat edilen alan (binhektar)	Dünya Üretimindeki Pay (yüzde)
Hindistan	8.8	922	9553	67.3
Avustralya	0.8	1430	538	5.9
Pakistan	0.6	599	996	4.6
Myanmar	0.5	1472	336	3.8
Türkiye	0.5	1199	409	3.8
Etiyopya	0.4	1802	236	3.3
İran	0.3	530	557	2.3
Meksika	0.2	1822	118	1.7
Kanada	0.2	2077	73	1.2
Amerika birleşik devletleri	0.1	1706	86	1.1
Dünya	13.1	957	1364	100.0

Kaynak: (FAO,2014: 23).

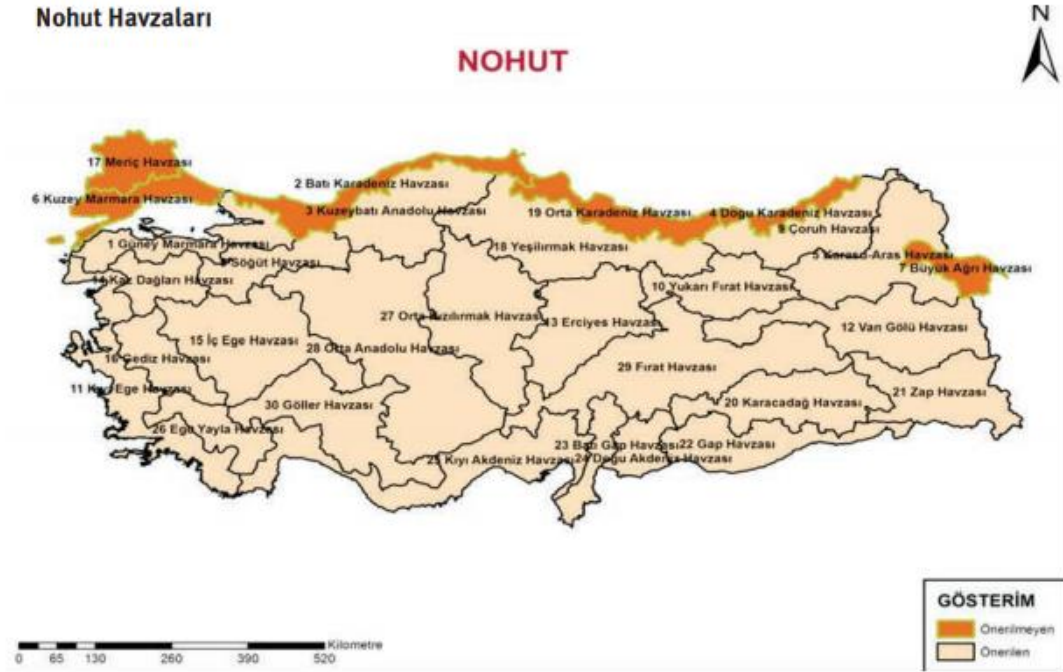
Nohut birçok ülkede üretilmekte ve yaygın olarak tüketilmektedir. 2012-2013-2014 yıllarında Dünya baklagil üretiminin %17'sini kaplamaktadır. Otuz yıllık durgunluk döneminden sonra gözlenen son yirmi yılda nohut üretimindeki artış ciddi miktarda olmuştur. Bu artış kendi tüketimi için üreten ülkelerin sayısı ile birlikte ihracat için üreten ülkelerin olmasıyla gözlenmektedir. Ortalama küresel verim 1989–91'de hektar başına yaklaşık 706 kilogramdan 2012-14'te hektar başına yaklaşık 957 kilografa yükselmiştir (FAO,2014: 21).

Yapılan son araştırmalarda Güneydoğu Anadolu bölgesindeki Diyarbakır, Şanlıurfa yöresinin nohudun ilk kültüre alındığı bölge olduğu bildirilmiştir. Birçok araştırmada “Anadolu Nohudu” ismiyle nohuttan söz ettikleri ve Türkiye’yi nohutun anavatanı olarak gösterdikleri bildirilmiştir (Çeker, 2008: 1). Dünya’da nohutun en fazla üretildiği ülke olan

Hindistan'da ilk üretim, Türkiye'de üretime başlanan tarihten 5000 yıl sonraya dayanmaktadır (Tabanlı, 2016: 3).

Türkiye'de en çok kabuli çeşidi üretilir ve Türk yemeklerinin önemli bir parçası olduğu için tüketimi de çok miktarda gerçekleşmektedir. Yıllık kişi başına 6,65 kilogramdır. Bu istatistiksel sonuca bakıldığı zaman Türkiye'de ortalama ulusal nohut tüketimi, dünyanın herhangi bir ülkesinden daha yüksektir. 1980'lere kadar Türkiye iç tüketim ve ihracat için nohut üretti. Üretimde ki artışla birlikte 1980'lerin on yılında küresel nohut ihracatının yüzde 60'ından fazlası Türkiye'den karşılandı. Sonraki yirmi yıl aynı derecede üretiminde düşüş yaşandı. Nohut ekilen alan, 1989-1991 yılları arasında 0.4 milyon hektar iken 2012-14'te 0.85 milyon hektarlık alana düştü. Bunun sonucunda, nohut üretimi 1989-91'de 0.8 milyon tondan 2012-14'te 0.5 milyon tona düştü. Üretimdeki bu düşüşün büyük sebebi tamamen nohut ihracatındaki düşüştür. Hindistan'da nohut üretiminde artış ve Avustralya ve Myanmar'da ihracata yönelik nohut üretiminde artış ile Türkiye'nin ihracatı 1990'lı yılların başından itibaren nohut üretiminde ve ihracatında keskin bir düşüş yaşandı. Son yıllara ait veriler, Türkiye'nin dünya nohut ihracatının yüzde 2'sinden azını oluşturduğunu ve net bir nohut ithalatçısı haline geldiğini göstermektedir (FAO,2014: 33).

Türkiye'de nohut yetiştiriciliğindeki düşüşü, tarımsal teşvik sisteminin geri çekilmesine ve girdi sübvansiyonlarının azaltılmasına bağlamaktadır. Çeşitli ülkelerdeki nohut üretiminin maliyetini ve karlılığını karşılaştırmış ve Türkiye'nin ABD, Kanada ve Meksika'dan rekabetle karşı karşıya olduğuna dikkat çekmiştir. Kuzey Amerika'da üretilen Kabuli nohut büyüklüğü daha büyüktü ve bu nedenle Türk nohutuna göre tercih edildi. Türkiye'de nohut üretimi, düşük mekanizasyon seviyeleri, zayıf pazarlama altyapısı ve Ascochyta yanıklığı nedeniyle sık ürün hasarı ile karakterize edildiğinden dolayı küçük çaplı kalmıştır (Şekil 1.1). ABD ve Kanada'da çok daha büyük üretim ölçekleri ve hem mekanizasyon hem de tarımsal uygulamalar nedeniyle önemli ölçek ekonomileri göz önüne alındığında, bu ülkelerdeki üretim maliyetinin Türkiye'ye göre oldukça düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca, Türkiye'de nohut ve buğday arasındaki geniş verim boşluğu, buğdayı çiftçiler için daha karlı bir ürün haline getirmiştir (FAO,2014: 34).



Şekil 1.1. Türkiye’deki Nohut havzaları harita görüntüsü

Kaynak: (Hasdemir, M. ve Terzi, D., 2015: 26)

1.2 Nohut Bitkisinin Genom Yapısı, Fizyolojik Ve Biyokimyasal Özellikleri

Nohut, $2n = 16$ kromozom ve 732 Mb genom büyüklüğü ile kendi kendine tozlaşan bir kuru baklagildir. Ekili nohutların iki farklı formu desi türleri (küçük tohumlar, açısısal şekil ve yüksek oranda lif içeren renkli tohumlar) ve kabuli tipleridir (büyük tohumlar, koçbaşı şekli, düşük lif oranlı bej renkli tohumlar). Bezelye şeklinde olarak adlandırılan üçüncü bir tip, orta ila küçük tohum büyüklüğü ve krem rengi tohumlarla karakterizedir. Desi türleri öncelikle Güney Asya’da, kabuli türleri ise ağırlıklı olarak Akdeniz bölgesinde yetiştirilmektedir. Nohut, karbonhidrat ve proteinlerin iyi bir kaynağıdır ve toplam tohum kuru ağırlığının yaklaşık % 80’ine katkıda bulunur. Nohut taneleri mineraller ve vitaminler bakımından zengindir ve aynı zamanda iyi bir hayvan yemi kaynağı oluşturur (Hari vd., 2008: 2).

Tablo 1.3. Nohut bakliyatlarının besin profili (taze ağırlık temelinde 100 g yenilebilir kısım başına)

İsim	Enerji(kcal)	Protein(g)	Yağ(g)	Diyet Lifi	Mevcut Karbonhidrat(g)
Nohut	337	20,4	5,2	20,7	42,0
Desi Nohut	332	21,2	5,0	21,2	40,0
Kabuli Nohut	359	20,8	6,1	20,8	48,9

Kaynak: (FAO,2014: 10)

Tablo 1.4. Bakliyatların mikrobesein profili (taze ağırlık temelinde 100 g yenilebilir kısım başına)

İsim	Demir	Magnezyum	Fosfor	Potasyum	Çinko	Bakır	Folik
Nohut	6,6	132	264	819	3,12	0,44	400
Desi Nohut	8,1	164	302	1080	3,26	0,57	390
Kabuli Nohut	5,9	114	254	767	3,11	0,37	400

Kaynak: (FAO,2014: 13)

Nohut fidesi hipogeal fide durumudur. Plumulanın büyümesi dik bir şekilde oluşur. İlk gerçek yaprağın iki veya üç çift broşürü ve bir uç ucu vardır. Birincil kök uzundur ve yan kökler üretir. Yapraklar, alternatif filotakside düzenlenmiş her bir düğümde tek tek doğar ve genellikle tek noktalı bileşiktir. Her yaprakta küçük bir yaprak sapı ile bir rachis üzerinde düzenlenmiş genellikle 11 ila 13 broşür vardır (Singh, 1997: 162).

Stipüller genellikle 3-5 cm uzunluğunda ve 2-4 mm genişliğindedir. Corolla hariç bitkinin tüm dış yüzeyleri glandüler ve aglandüler kıllarla kaplıdır. Ayrıca loblu nodüllerin geliştiği bildirilmiştir (Singh, 1997: 162).



Şekil 1.2. Nohut fidesi durumu

Nohutta, dalların dikeyden açısına dayanan beş büyüme alışkanlığı ayrılır: dik, yarı dik, yarı yayılma, yayma ve secde. Çoğu araştırmacı dallanma modelini tanımlamak için birincil, ikincil ve üçüncül terimleri kullanır. Genel olarak, bitkiler 20 ila 100 cm yüksekliğe ulaşır, ancak uygun koşullar altında uzun kültür bitkileri 130 cm'ye kadar büyüyebilir. Çiçekler tipik olarak papilionludur. Genellikle aksiller rasemlerde tek başlarına taşınırlar, ancak ikiz çiçekler de bulunabilir. Çiçekler, 6-13 mm uzunluğunda bir pedicel ve peduncle üzerinde aksiller rasem üzerinde ortaya çıkar. İkiz çiçek monojenik resesif bir özelliktir. Corolla genellikle desi tipinde mor, kabuli tipinde beyazdır ve nadiren mavidir. Cicer cinsindeki bitkiler, çiçek başına sadece bir karpel içermektedir (Singh, 1997: 162).

Nohut, bitki başına çok az ila 1000 kapsülden değişen kapsülleri şişirmiştir. Kapsül boyutu çok değişir, ancak ortamdan en az etkilenen özelliktir. Kapsül şekli eşkenar dörtgen,

dikdörtgen veya oval olarak tanımlanır. Kapsül doldurma hava koşullarına oldukça bağlıdır ve% 8,97 ila 56,53 arasında değişir. Ancak çiçeklerin büyük bir kısmı ve bakla apsesi nohut çiçeklerinde bol miktarda bulunur. Çiçek üretim şekli, bakla tutma, üretilen çiçek sayısı ve kesilen çiçek ve bakla yüzdesi ekim tarihi ve çeşidine göre değişmektedir. (Singh, 1997: 162).

Tohum karakteristik olarak sivridir, sıklıkla açısall ve buruşuktur. Bezelye gibi nadiren yuvarlaktır. Üç şekil tanınır: açısall (gaga veya koç başı şeklinde), baykuş (baykuş başı şeklinde) ve bezelye (neredeyse yuvarlak şekil). Tohum yüzeyi buruşmuş, pürüzsüz veya tüberkülyasyonlu olabilir. 100 tohumun ağırlığı 8 g'dan azdan 70 g'a kadar değişir. Tohum rengi 21 farklı renk ve renk tonu ile nohutta önemli bir ayırt edici karakter taşırmaktadır (Singh, 1997: 162).

Nohut kurak ve yarı-kurak bölgelerde yetiştirilebilen bitkidir ve koyu renkli olarak yetiştirilir. Kurağa ve sıcağa en fazla dayanıklı mercimekten sonra ikinci yemeklik baklagil bitkisidir. Derinlere inebilen köklere sahiptirler. Gövde ve yaprakları tüylerle örtülüdür. Epidermis tabakası ile bazıları kaplıdır. Nohutların bu özellikleri yardımıyla kurak bölgelerde kolaylıkla yetiştirilmesi sağlanır. Nohudun toprakta çimlenebilmesi için vejetasyon süresi 60-90 gündür ve toprak ısısı +3° C'den fazla olmalıdır. Optimum çimlenme sıcaklığı için 15° C ihtiyaç vardır. 26° C'den fazla sıcaklık dereceleri çimlenme üzerine olumsuz olarak etkilemektedir. Nohut türlerinin optimum sıcaklık dereceleri 18-26° C arasında değişmektedir. Nohut -10° C'ye kadar soğuğa dayanabilir. Fazla nemden hoşlanmazlar. Yağışlı mevsimlerde fungal hastalıklara ve kök çürüklüğüne yakalanarak verimleri düşük olur. Bunun için normal olarak hiç sulamadan da yetiştirilebilir. Yemeklik baklagiller içinde kirece ve tuzluluğa en fazla dayanan bitkidir. Bu nedenle de topraklarda tuzluluk oranı arttığı zaman nohut bitkisi baklagil olarak özel bir öneme sahiptir. Nohut için en ideal nohut yetiştirme toprağı kumlu-tınlı topraklar olmakla beraber nohut her türlü toprakta yetiştirilebilir. Fazla asitli topraklardan hoşlanmaz (optimum pH=7,5-8,0). Fazla yağış bitkide olumsuz etki yapar. Toprak şartlarına bağılı olarak vejetatif gelişme süresi sulama ya da hafif yağış istemektedir (Hasdemir, M. ve Terzi, D., 2015: 4).

Sonbaharda toprağı 10-15 cm alttan işleyen aletlerle toprak sürölür ve kışa bırakılır. Kuru tarım sisteminin uygulandığı bölgelerde nohut yetiştiriciliğinde toprağı fazla işlenmesine gerek yoktur. Nohudun ekim zamanı memleketimizde farklılıklar gösterir. Orta Anadolu'da nohut ekimi Mart ayının ikinci yarısı ile Nisan ayı başlarında, Doğı Anadolu'da ise Nisan ayı ortası ile Mayıs ayı başlarında yapılmaktadır. Erken ekim yapılma durumunda

yabancı ot problemi görülebilmektedir. Nohut çeşidinin antraknoza dayanıklı olup olmadığını bilmek ekime karar vermek için önemlidir. Antraknoza tolerant çeşitlerinde (Damla 89, Gülümser ve Çağatay gibi) şartların uygun olduğu Mart ortasından itibaren Amasya, Tokat ve Çorum'da ekilebilmektedir. Hassas nohut çeşitlerinde (İspanyol ve Canitez gibi) ekim için Mayıs ayı beklenmelidir (Hasdemir, M. ve Terzi, D., 2015: 4).

Ekim serpme veya makinalı ekim yapılmaktadır. En ideal ekim metodu tohum ekme makineleriyle sıraya ekimdir. Memleketimizde en çok serpme, daha sonra 3 sıraya ekim tercih edilir. İdeal sıraya ekimde ekim derinliği 5-6 cm olmalıdır. Bu derinlikten fazla ekilecek olursa, çimlenme zamanı, bitki başına düşen bakla ve çiçek sayısı azalır, çiçeklenme yavaş seyreder. Toprak analizleri sonucuna bakılarak yapılan gübreleme uygun olacaktır. Genel olarak ekim zamanı, azotlu ve fosforlu gübreler verilmelidir. Dekara ortalama 2-3 kg N ve 4-6 kg P₂O₅ ile gübreleme yapılmaktadır (Hasdemir, M. ve Terzi, D., 2015: 4).

Yapraklar ve meyveler saman sarısı rengine döndüğünde hasat zamanı gelmiş demektir. Hasat elle veya makine ile yapılabilir. Nohutta yetiştiricilik sezonu 4-5 ay devam ettikten sonra hasat yapılmaktadır (Hasdemir, M. ve Terzi, D., 2015: 4).

1.3 Nohut Bitkisinin Önemi

Nohut (*Cicer arietinum L.*), dünyanın en önemli tahıl baklagillerinden biridir ve tohumu insanlar için bitki-bazlı diyet proteininin ana kaynağıdır (Gan vd., 2006: 122).

Dünya üzerinde oluşan çevre sorunları, üretim azlığı, hayvansal ürünlerin maliyetli olması ve hızlı nüfus artışına bağlı olarak açlık çeken insan sayısı hızla artmaktadır. Bu nedenle de bitkisel kaynaklı protein ihtiyacı çoğalmıştır (Bayrak, 2010: 1). Nohut bitkisi diğer baklagiller ile kıyaslandığında %21-24 oranında protein içermesiyle fasulye çeşitlerinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. İşte tam da bu nedenden dolayı nohut hayatımızda önemli bir yere sahiptir. Nohut bitkisinin protein içeriğinde çocukların gelişimi içinde önemli olan histidin aminoasidi dışında lösin, izolösin, lizin, sistein ve fenilalanin amino asitleri ile daha düşük seviyelerde metiyonin, triptofan ve valin aminoasitleri bulunmaktadır. Diğer protein kaynaklarına göre daha ucuz ve kolay elde edilebilir olmaları, antioksidan içermeleri nedeniyle kanser riskini azaltmaktadır. Ayrıca içermekte olduğu kalsiyum, magnezyum, fosfor, demir, potasyum, çinko, bakır, folik asit gibi elementler, B1, B2, B3 gibi vitaminler bakımından beslenmede oldukça önemlidirler. Kolesterol içermemesi, posa içeriklerinin yüksek ve yağ oranının düşük olması nedenlerinden dolayı kalp damar hastalıkları ve

diyabetik hastalar için tercih edilmesi gereken besindir. Bitkinin çağımızın hastalığı obeziteyle mücadele programlarında önemle yer alması da gerekmektedir (Hasdemir, M. ve Terzi, D., 2015); FAO,2014: 31-11).

Nohut bitkisi tüm bu özelliklerinin yanı sıra toprak verimliliğinin artırılması için gübrelemede de faydalıdır. Toprakta bazı hastalıkların ve zararlıların giderilmesinde oldukça önemlidir. Nohut bitkisi Rhizobium bakterileri ile birlikte yaşayabilme özelliğinden dolayı havadaki serbest azottan da faydalanabilmektedir. Ayrıca bitkinin hasatından sonra toprakta kalan köklerinde karbon/azot oranı çok düşük olduğundan kısa zamanlarda parçalanarak humusa dönüşebilmekte ve böylelikle kendinden sonraki bitkiler için uygun topraklar oluşturabilmektedir. Nohut bitkisinin su isteğinin de az olması yetiştirenler için bir avantajdır (Hasdemir, M. ve Terzi, D., 2015: 32).

İnsan beslenmesinde kullanılmasının yanında tane ve sapları hayvan beslenmesinde de kullanılmaktadır. Bu bitkilerin sap ve samanında düşük selüloz vardır. Artıklarında çok yüksek oranda protein bulunmaktadır. Bu artıklar kırılarak, ıslatılarak ya da pişirilerek belli oranlarda hayvanlara verilebilirler. Hayvan beslenmesinde büyük yeri olan tahıl saplarının iki katı ham protein içerirler. Ayrıca baklagil sap ve tanelerinde bulunan proteinlerin hazmı kolaylaştırma oranı tahıllara oranla oldukça yüksektir (Hasdemir, M. ve Terzi, D., 2015: 33).

Nohut FAO,2014:2 verilerine göre, Dünyanın farklı yerlerinde yaygın olarak üretilir ve tüketilir. 2012-13-14 yıllarında Dünya'daki kuru baklagil üretiminde fasulyeden sonra ikinci sırada üretilen baklagil nohuttur. Sırasıyla kuru fasulye üretimi yaklaşık 24 milyon ton, nohut üretimi yaklaşık 13 milyon ton, kuru bezelye üretimi yaklaşık 11 milyon ton ve börülce üretimi yaklaşık 7 milyon ton olmuştur. Ülkemizde ise üretilen kuru baklagil miktarında ilk sırayı almaktadır.

1.4. Antraknoz Hastalığı (*Ascochyta rabiei*) Etmeninin Tanımı ve Yaşayışı

Antraknoz hastalığı (*Ascochyta* yanıklığı) hem kültür nohutunda hem de yabani nohut türlerinde konukçu özgülüğü gösteren *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. adlı patojenin neden olduğu fungal bir hastalıktır (Tabanlı, 2016: 8). Patojen ilk defa Fransa'da 1867 yılında Passerini tarafından tek hücreli ve şeffaf pikniosporlarına bakılarak *Zythia rabiei* olarak adlandırılmıştır. Comes 1891 yılında fungusu *A.pisi* Lib., Trotter ise 1918 yılında *Phyllosticta*'ya benzediğini savunarak etmeni *P. rabiei* (Pass.) Trotter olarak adlandırmıştır.

Son olarak Labrousse 1931 yılında fungusu %2-4 oranında tek bölmeli sporların olmasını gözlemleyerek *A. rabiei* olarak adlandırmıştır (Atasagun, 2009: 5).

Hastalık dünyada nohut üretimi yapılan alanlarda yaygın olarak görülmektedir ve en az 35 ülkede tespit edilmiştir. Ülkemizdeki varlığı ise ilk defa 1948 yılında Bremer tarafından İç Anadolu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde belirlenmiştir (Arıcı ve Evsen, 2018: 489). Nohutta önemli verim kayıplarına yol açmaktadır. Özellikle patojenin gelişimi için uygun çevre ve iklim şartlarının varlığında %100'e varabilen kayıplarla sonuçlanabilir (Tabanlı, 2016: 8).

Ascochyta rabiei'nin telemorfu *Didymella rabiei* orijinal olarak Kovachevski (1936) tarafından Mycospharella cinsine dahil edilmiş fakat daha sonra Muller ve von Ark. (1962) tarafından pseudotesyum büyüklüğü, askospor büyüklüğü, fasikülat olmayan askusların ve pseudoparafizlerin varlığı temel alınarak *Didymella* türü olarak alınmıştır (Atasagun, 2009: 8).

Tablo 1.5. *Ascochyta rabiei* adlı patojenin taksonomik sınıflandırması.

KİNGDOM	Fungi
PYLUM	Ascomycota
CLASS	Dothideomycetes
SUBCLASS	Dothideomycetidae
ORDER	Pleosporales
FAMİLYA	Didymellaceae
GENUS	<i>Ascochyta</i> (<i>Didymella</i>)
SPECİES	<i>Ascochyta rabiei</i> (<i>Didymella rabiei</i>)

Kaynak: (Tabanlı, 2016: 8).

1. 5. Hastalığın Belirtileri, Yayılışı ve Ekonomik Önemi

Hastalık etmeni bitkinin tüm yer üstü kısımlarına saldırır. Broşürlerde lezyonlar yuvarlak veya uzamış, düzensiz olarak gözlenen kahverengi noktalar ve çevresinde kahverengimsi kırmızı bir kenar bulunur. Yeşil baklalarda lezyonlar genellikle koyu kenar boşluklu daireseldir ve eşmerkezli daireler halinde düzenlenmiş piknidilere sahiptir. Genellikle enfekte olan tohumlarda lezyon taşır (Nene, 1982: 62).

Gövde ve yaprak sapında lezyonlar uzunluğu 3-4 cm olacak şekilde kahverengidir ve siyah noktalar taşır. Kahverengi kısım genellikle etkilenen kısmı çevrelemektedir. Lezyonlar gövdeyi kuşattığında, atak noktasının üstündeki kısım hızla ölür ve sarı renkte gözlenir. Eğer lezyonlar ana gövdeden sonra yaka bölgesini kuşatılırsa tüm bitki ölür. Hastalık ilerledikçe,

hastalıklı bitkilerin yamaları tarlada belirginleşir ve tüm alanı kapsayacak şekilde yavaşça yayılır (Nene, 1982: 62).



Şekil 1.3. Nohut antraknozu hastalığının **a)** Sap ve dallarda oluşturduğu belirti **b)** Nohut yapraklarında oluşturduğu çevresi sarı renkli kahverengi lekeler

Kaynak: (Kılıç vd., 2017: 59)



Şekil 1.4. Nohut antraknozu hastalığının **a)** Nohut Kapsülünde oluşturduğu belirti **b)** Nohut danesindeki belirtisi

Kaynak: (Kılıç vd., 2017: 59)



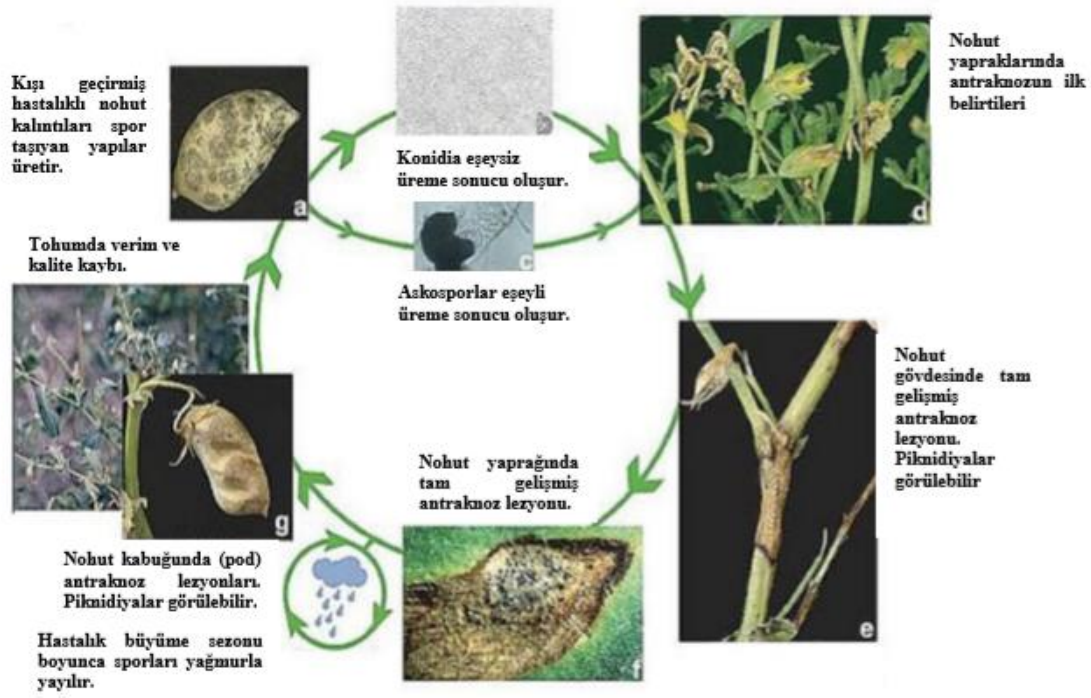
Şekil 1.5. Ascochyta yanıklığının tohumdaki semptomları

Kaynak: (Atasagun., 2009: 45)

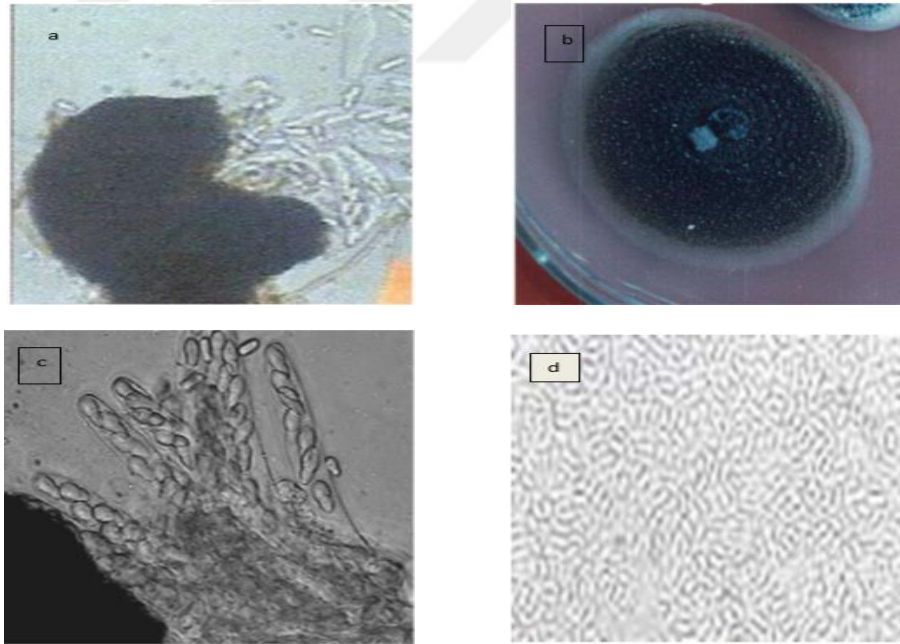
,*A. rabiei* heterotallik bir mantar olarak erkek ve dişi ayrı hifaları üzerinde barındırır. Nohut bitkisindeki hayat döngüsünde eşeyli ve eşeysiz dönemleri vardır. Eşeysiz dönem hastalığın yayılması ve eşeyli dönem ise yeni ırklarının oluşturmaları açısından önemlidir. Hastalık patojeninin eşeyli üremesi ilk kez 1936 yılında Bulgaristan'da Kovacheski adlı bilim adamı tarafından belirlenmiştir ve sonraki yıllarda 29 ülkede hastalık rapor edilmiştir. Eşey tiplerinin oranlarının bilinmesi, eşeyssel üreme ve rekombinasyon hakkında bilgileri bizlere sunmaktadır. Bu konuda ülkemizde yapılan çalışmalara ait raporlarda nohut yetiştirilen bölgelerdeki analizler sonucu patojen izolat sayıları çoğunlukla popülasyonları tam olarak aydınlatamamaktadır (Tabanlı, 2016: 9).

Ascochyta yanıklığı hastalığında, primer inokulum kaynağı pseudotesyumlardan (ascostroma; konukçu dokuya gömülü armut şeklindeki ucu açık yapı), salınan askosporlar enfeksiyonu başlatır ve daha sonra da bu sporlar metrelerce taşınarak yeni enfeksiyonları ortaya çıkarır. Mantarın eşeyli üremesi sonucu tarladan tarlaya yayılması gerçekleşebilir. Eşeyssel üreme sonucu oluşan rekombinasyon, patojen popülasyon genetik yapısının şekillenmesini sağlar ve bu sayede birbirinden farklı yapıya sahip patotipler oluşabilir (Tabanlı, 2016: 9).

Askosporların oluşturduğu bu ilk enfeksiyondan sonra bitkinin toprak üstü kısımlarında (gövde, yaprak, tohum kapsülü) oluşan eşeysiz sporlanma ile piknidyalardan salınan pikniosporlar ya da konidia etmenin oluşturduğu zararları yansıtmaktadır. Bu enfeksiyon oluşma süresinde üreme için uygun çevre koşulları (düşük sıcaklık ve yüksek nem) olduğunda yoğun epidemiler meydana gelmekte ve ürün kaybı %100 seviyesine ulaşabilmektedir (Tabanlı, 2016: 9).



Şekil 1.6. *Ascochyta rabiei* adlı mantar patojeninin hayat döngüsü
Kaynak: (Tabanlı, 2016: 10).



Şekil 1.7. *Ascochyta rabiei*'nin eşeyli ve eşeysiz üremesi sırasındaki sporlarının mikroskop görüntüleri a) Peritesyumdan Çıkan Askosporları b) Etmenin PDA'da gelişimi c) Askus ve Askosporları d) Pikniosporları(Konidileri)
Kaynak: (Atasagun,2009: 42)

Pikniosporlar yağmur yoluyla kısa mesafede, askosporlar ise rüzgar yoluyla uzak mesafelere kadar taşınabilmektedir. Ekim ve Nisan ayları arasında yağışların artması (150 mm veya daha fazla) durumunda hastalık etkilerini çok daha şiddetli olarak gösterebilmektedir. Çiçeklenme dönemlerinde yağış olması halinde de ekilen ürünler tamamen hastalıktan etkilenebilmektedir, fakat yağışın olmaması durumuna hastalık gelişimini tam olarak sağlayamamakta ve etkisini tam olarak gösterememektedir (Tabanlı, 2016).

Hastalık yayılmasında insanlar, hayvanlar ve çeşitli araçlarla da önemli rol oynamaktadır. Etmenin askosporları, hastalık görülen tarlalardan yaklaşık 10-15 km uzaklıktaki tarlalarda enfeksiyona neden olacak şekilde yayılabilmektedir (Tabanlı, 2016).

Nohut tarlalarında *Ascochyta* yanıklığının epidemilerinde % 50 'nin üzerinde ürün kayıplarının olduğu ve patojenin etkisinin tam olarak gözüktüğü alanlarda bu kayıpların % 100'e yaklaştığı rapor edilmektedir. Nohutta *Ascochyta* yanıklığının etkisi çok fazla boyutlarda olurken, mercimek ve bezelyede hastalığın etkileri nohuda göre daha azdır ve ciddi epidemi durumu altında bile bitkilerin tamamen zarara uğraması sık gözlenmemektedir. *Ascochyta rabiei* (Pass.) patojeninin neden olduğu antraknoz hastalığı nohut yetiştiriciliği yapılan tüm ülkelerde üretimi etkileyen en önemli faktör olarak bilinmektedir. Patojen için uygun iklim ve çevre koşullarının meydana geldiği yıllarda hastalığın epidemisi ile ciddi ürün kayıpları yaşanmaktadır. Ülkemizde de antraknoz hastalığının nohut üretiminde önemli bir problem olduğu belirtilmiştir (Atasagun, 2009: 18).

1. 6. Konukçuları

Cicer genusundaki bitkiler etmenin konukçuları olmakla birlikte fungus yonca (*Medicago sativa*) ve tarla bezelyesi (*Pisum sativum*) bitkilerine de enfekte olmuştur. Ancak sadece nohutta ciddi ürün kayıplarına yol açarak oldukça büyük bir önem teşkil etmektedir (Atasagun, 2009: 12).

Ascochyta rabiei patojeni hem kültür nohutunda (*Cicer arietinum* L.) hem de yabani nohut türlerinde (*Cicer* spp.) konukçu özgülüğü göstermektedir (Tabanlı, 2016: 8).



Şekil 1.8. Nohut antraknoz hastalığının a,b; nohut yapraklarında, c,d; nohut sapındaki belirtileri
Kaynak: (Apaydın vd., 2008: 59).

1. 7. Hastalıkla Mücadele

Kültürel önlemler olarak, tohumluk hastalığın görülmediği tarlalardan alınmalıdır. 2-3 yılda bir ekim nöbeti yapılmalıdır. Hasattan sonra, tohumluk kısmı 7-8 gün güneş altında yayılarak kurutulduktan sonra depoya kaldırılmalıdır (Kılıç vd., 2017: 59). Ayrıca tohumluk partilerde hiç enfeksiyon olmasa da tohumlara fungusit uygulamasını tavsiye etmektedirler (Atasagun, 2009: 18). Tarlalarda hastalığın ilk görüldüğü kısımda bulunan hastalıklı nohut bitkileri sökülerek tarladan uzaklaştırılmalıdır. Nohut bitkisinin ekim anında tohumların normal derinliğe düşmeleri sağlanmalıdır. Üretim için hastalığa dayanıklı çeşitler tercih edilmelidir (Kılıç vd., 2017: 59).

Hastalık etmeni ile enfekteli tohumlar, belirli derecelerdeki sıcaklıklarda belli sürelerde muamele edildiğinde tohumlarda fungusun elemine edildiği, bununla birlikte tohum çimlenme oranının düştüğü bildirilmiştir. *A. rabiei* ile bulaşık tohumlar güneş ışığına maruz bırakıldıklarında yaklaşık olarak etmenin % 50 oranında azaldığı, fakat tohumların çimlenmesinin etkilenmediği görülmüştür. Başka bir çalışmada *A. rabiei* ile enfekteli nohut tohumlarını 55, 60 ve 65 °C sıcaklıklarında 6-12 saat bıraktıklarında fungusun tamamen yok olduğunu, buna karşın tohum çimlenmesinin % 50 azaldığını belirtmişlerdir (Atasagun, 2009: 19).

Dirençli hatların kullanımı *Ascochyta* yanıklığını kontrol etmek için en pratik yol olduğundan, genetik direnci geliştirmek, tüm dünyada nohut ıslah programlarının temel amacıdır. Konukçu bitki direnciyle kontrolü üzerinde çok az ilerleme kaydedilmesinden dolayı yüksek düzeyde dirençli çeşitlerin geliştirilmesi kaynakların eksikliği nedeniyle yavaş ilerlemektedir. Orta derecede dirençli konukçu kullanımı ve fungusit uygulaması gibi kombinasyonların yapılması tercih edilmektedir (Atasagun, 2009: 19).

Kısmen dayanıklı çeşitlerin çiçeklenme dönemine başlarken enfeksiyona karşı daha hassas olduklarını bilinmektedir. Orta düzeyde dayanıklı çeşitleri kullanmak yalnız başına hastalığı baskı altına almada yeterli olmadığında yapraktan fungisit uygulama programlarına gereksinim duyulmaktadır. Bu amaçla Amerika Birleşik Devletleri'nin North Dakota eyaletinde koruyucu fungisit olarak chlorothalonil ve maneb kullanılmıştır. 2002-2004 yıllarında ise chlorothalonil kullanımından sonra iki kez azoxystrobin ve pyraclostrobin uygulaması tarlada bitkilerde hastalık simptomlarının çıkışında azalmalar ve üründe önemli verim artışlarıyla sonuçlanmıştır (Atasagun, 2009: 21).

Kanada'da yapılmış bir çalışmada azoxystrobin ve pyraclostrobin dönüşümlü olarak 2-5 kez uygulanmasında *Ascochyta* yanıklık hastalığı şiddetinin diğer ilaç uygulanmayan kontrollerle karşılaştırıldığında önemli derecede azaldığını belirlemişlerdir. Bir başka bilim adamının çalışması olan tarla denemelerinde boscalid ve prothioconazole uygulamasının *Ascochyta* yanıklık hastalığının şiddetini azaltarak üründe artışa neden olduğunu bulunmuştur. Kanada'da yapılan denemelerde boscalid uygulamasının ürün veriminde artışa neden olduğunu belirlenmiştir (Atasagun, 2009: 21).

Tarla bulaşıksa veya çevrede enfekteli alan varsa *Ascochyta rabiei*'nin kontrolünde tohum ilaçlaması bazen yeterli olmayabilmektedir. Bununla birlikte etkili fungusitlerle tohum ilaçlaması büyük ölçüde başlangıç inokulum seviyesini azaltmakta ve hastalığın temiz alanlara yayılmasını önlemektedir. Bir grup kimyasallar bu etmen için denenmiş ve bunların bazıları kısmen etkili bulunmuştur. 1983'de yapılan bir çalışmada thiram+benomyl karışımının hastalığın tohumdan geçişini önleyerek kök çürüklüğünü de azalttığını bildirmiştir. Başka bir çalışmada Mancozeb, Maneb, Propineb, chlorothalonil kullanılan ilaçların birkaçıdır. 1993'de yapılan bir çalışmada prochloraz ve prochloraz+mancozeb karışımının 2 kez uygulandığı vakit hastalığın kontrolünde etkili olduğunu ve verimde artış olduğunu belirtilmiştir (Atasagun, 2009: 22).

2003 yılında spor çimlenmesi üzerine en etkili fungisidin diniconazole olduğunu ve sırasıyla bunu difenoconazole, tebuconazole ve carbendazim'in takip ettiğini, patojenin tohum enfeksiyonuna karşı fungusitten benomyl+thiram, carbendazim ve carbendazim+chlorothalonil uygulamasının en etkili olduğunu, tarla uygulamalarında ise azoxystrobin, chlorothalonil ve mancozeb fungusitlerinin en etkili olduğunu tespit edilmiştir (Atasagun, 2009: 21).

1. 8. Antraknoz Hastalığına Karşı Direnç Genleri

Nohut germplazmasında tam direnç olmaması nedeniyle ascochyta yanıklığına dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesinde sınırlı başarı elde edilmiştir. Bugüne kadar, çeşitli genetik arka planlarda ascochyta yanıklığı direnci ile ilişkili birkaç niceliksel özellik lokusu (QTL) tanımlanmıştır. Yine de, ascochyta yanıklığına karşı kesin direnç mekanizması hala bilinmemektedir (Mandeep vd., 2017; Millan vd., 2003: 3-374).

Çeşitli bitki türlerine karşı çeşitli patojenlere karşı dirençte büyük rol oynayan NBS-LRR genleri de dahil olmak üzere çok sayıda bitki hastalığına karşı direnç geni tanımlanmış ve klonlanmıştır. NBS-LRR genlerinin çoğunun, salisilik asit (SA) savunma yanıtının aktivasyonuna yol açan bir "gen-gen" veya "koruyucu" model konakçı-patojen etkileşimi sonrasında biyotrofik patojenlere karşı direnç sağladığı bilinmektedir. Nekrotrofik patojenlere karşı direnç mekanizması bilgisi, fitotoksin üretimi ve jasmonik asit (JA) ve etilen yolunun aktivasyonu ile sınırlandırılmıştır. NBS-LRR genlerinin nekrotrofik patojene karşı duyarlılık ile bir ilişkisi farklı çalışmalarda gözlemlenmiştir. Son çalışmalar ayrıca NBS-LRR genlerinin nekrotrofik patojenlere karşı direnç reaksiyonunda rol oynadığını göstermiştir (Mandeep vd., 2017; Millan vd., 2003: 3-374).

Nohutta Ascochyta yanıklığına karşı NBS-LRR genlerinin ilişkisi şu ana kadar bildirilmemiştir. NBS-LRR genlerinin frekansı, bitki türleri arasında oldukça değişkendir. Nohut NBS-LRR gen frekansı %0.21-%1.6 aralığına girer. Birkaç çalışma, NBS-LRR gen frekansı ile genom büyüklüğü veya toplam açıklamalı genler arasında bir korelasyon olmadığını göstermiştir. NBS-LRR genlerinin düşük kopya sayısının açıklanması için bir hipotez, NBS-LRR genlerinin, bitki genomundaki NBS-LRR genlerinin sayısını kısıtlayan bitki hücreleri üzerindeki uygunluk durumu ve ölümcül etkisinden kaynaklanabilir (Mandeep vd., 2017; Millan vd., 2003: 3-374).

Nohut NBS-LRR gen ailesinin çoğu, diğer bitki türlerinde gözlemlendiği gibi temel korunmuş alanlara sahiptir. 121 NBS-LRR geninden 98 gen, hem NBS hem de LRR alanlarından oluşan proteinleri kodlar ve geri kalan 23 gen eksiktir. Gerekli tüm yapısal motiflerin varlığı, bağımsız R-proteinleri olarak işlev yapma kapasitelerini gösterir. Bununla birlikte, kesilmiş veya eksik genlerin de tam genlerle işbirliği içinde bir işlevi olduğu bildirilmiştir. Bir çalışmada ayrıca kesilmiş NBS-LRR genlerinin Ascochyta yanıklığı enfeksiyonu üzerine yukarı regülasyonu gösterilmiştir (Mandeep vd., 2017: 1).

Nohut NBS-LRR gen ailesi, alan mimarilerine göre sekiz ana sınıfa ayrılmıştır. Genel olarak, TNL sınıfı genellikle monokot türlerinde eksiktir. Bir dikotil türü olan nohut TNL sınıfı içerir ve sayıları 39'dur. NBS-LRR genlerinin evriminin monokotlar ve dikotlar arasında önemli ölçüde farklılaştığı bilinmektedir. TNL'nin TNL / CNL sınıfından olmayan evrimsel ayrışması birçok çalışmada gözlenmiştir. RPW8'in, CNL klonu içerisinde RPW8'in ortak CNL genlerinden fonksiyonel ayrışmasını destekleyen ayrı bir alt klon oluşturduğu da gözlenmiştir. Bir Filogenetik analiz sonucu, nohut NBS-LRR genlerinin benzer paternleri izlediğini gösterilmektedir. Filogenetik analizler, TNL, CNL, RNL ve NL ve C-terminal LRR domaini taşımayan benzer sınıflar olarak sınıflandırma kriterlerimizi destekler (Mandeep vd., 2017: 11).

NBS-LRR genleri tüm nohut kromozomlarına dağıtılmıştır. Bununla birlikte, kromozom 5 en fazla sayıda NBS-LRR geni içerdiğinden ve en düşük kromozom 8 olduğu için dağılım kromozomlar arasında bile değişkendir. Sıklıkla NBS-LRR genlerinin genetik varyasyona ve hızlı evrime katkıda bulunabilecek kümelerde mevcut olduğu gözlenmiştir. Nohutta, NBS-LRR genlerinin neredeyse yarısı (% 48) kümelerde bulunmuştur. Bu kümelenmiş genler arasında, mono kümeler (% 78), bu genlerin ardışık kopyalar yoluyla evrimleşmiş olabileceğini yansıtan karışık kümelerden daha fazladır. NBS-LRR genlerinin kümelenmesinin bir başka önemi, fonksiyonel olarak ilişkili genlerin tandem kümelenmesinin birlikte ifadeyi kolaylaştırması ve pirinçte ve *Arabidopsis*'te (Dirikata) direnç göstermesi için patojen efektör molekülleri ile etkileşime girebilecek fonksiyonel heterodimerler oluşturmasıdır. Mandeep ve ark., 2017 'un yaptığı bir çalışmada ekspresyon analizler sonucu kümede bulunan NBS-LRR genlerinin benzer ekspresyon paterni gösterilmiştir. Kromozom 2 üzerinde QTL1'de bulunan küme 3'ün iki NBS-LRR geni (LOC101501248 ve LOC101502198), her genotipte benzer indüksiyon paterni göstermiştir. Üç NBS-LRR geninden (LOC101498365, LOC101498707 ve LOC101499030) oluşan kromozom 3 üzerinde QTL2 ile birlikte bulunan Küme 2 de her genotipte benzer ekspresyon paterni göstermiştir. Bu kümelenmiş genlerin birlikte ekspresyonu, ortak direnç mekanizmasına potansiyel katılımlarını yansıtır (Mandeep vd., 2017; Millan vd., 2003: 11-374).

QTL bölgelerindeki ko-lokalize genler, farklı özelliklerle ilişkili potansiyel aday genleri tanımlamak için başarıyla kullanılmıştır. Nohutta, CaETR1 ve Ein3, *Ascochyta* yanma direnci için sırasıyla QTLAR1 ve QTLAR3 ile birlikte lokalizasyonlarına dayanarak *ascochyta* yanıklığı direnci için aday genler olarak tanımlanmıştır (Madrid ve ark., 2012, 2014). Soya fasulyesinde, NBS-LRR genlerinin sayısı ile her kromozom üzerindeki hastalık

direnci Q TL'leri arasındaki güçlü pozitif korelasyon, bu gen ailesinin soya fasulyesi hastalık direncine katkısını yansıtmaktadır. NBS-LRR genlerinin nohutta *Ascochyta* yanık yanıtı ile ilişkisi rapor edilmemiştir. Burada 30 NBS-LRR geni rapor edilmiştir (Mandeep vd., 2017: 11).

Kromozom 2, 3, 4, 6 ve 8 üzerindeki dokuz *Ascochyta* yanma direnci Q TL'lerinin fiziksel pozisyonu daha önceki çalışmalarda lokalize olmuştur. NBS-LRR genlerinin kümeleri ayrıca nohut kromozomu 2, 3, 4 ve 6'daki AB-Q TL'ler içinde tanımlanmıştır. Kromozom üzerinde AB-Q TL ile birlikte lokalize üç CNL sınıfı gen kümesi, *P. parasitica*'nın beş izolatına karşı direnç sağlayan *Arabidopsis* RPP13 geni ile yüksek sekans benzerliği göstermiştir (Mandeep vd., 2017: 11).

Ascochyta rabiei izolatı AR-170-3, her üç genotipte de nekrotik lezyonların üretilmesinde açıkça görüldüğü gibi hem duyarlı hem de orta derecede dirençli genotipleri enfekte eder. Orta derecede dirençli genotipler (CDC Luna ve CDC Corinne), duyarlı genotipe (ICCV 96029) kıyasla gecikmiş semptom gelişimi gösterdi. AB-Q TL'lerde ko-lokalize NBS-LRR genlerinin çoğu, kontrole kıyasla bir zaman noktasında en az bir genotipte farklı ekspresyon gösterdi. Bununla birlikte, bu genlerin, bu genotipler üzerindeki hastalığın ilerlemesi ile ilişkili olan dirençli genotiplere kıyasla, enfeksiyonun erken saatlerinde enfeksiyonun erken saatlerinde yukarı regülasyonu gözlemlenmiştir. Bazı NBS-LRR genlerinin genotipine özgü ekspresyon paterni de gözlemlendi (Mandeep vd., 2017: 11).

İki NBS-LRR geni (LOC101509145 ve LOC101498915) yalnızca orta derecede dirençli çeşit CDC Corinne'de yukarı regüle edildi. Kromozom 8 üzerinde QTL5 ile birlikte lokalize olan bir gen (LOC101505949), CDC Corinne'de 12 hpi hariç, tüm *Ascochyta* yanık aşılınmış numunelerinde yukarı regülasyon gösterdi. Bu gen, *Arabidopsis* ARD1 benzeri genlerle (AT4G33300) çok yüksek sekans benzerliğine sahipti. *Arabidopsis* ARD1 benzeri gen, SA biriktiren ve biyotrofik patojene karşı geniş direnç sağlayan bir RPW8-NBS-LRR sınıf genidir. Varlık biyotrofik direnç geninin *Ascochyta* yanıklık direncindeki QTL, biyotrofik ve nekrotrofik patojenlere karşı direnç sağlanmasında ortak savunma mekanizmasının yer alabileceğini düşündürmektedir. NBS-LRR genlerinin yanı sıra, EIN3 geni QTL2 ve QTLAR3'teki NBS-LRR genleri ile birlikte lokalize edildiğinden, AB-QTL aralığında diğer hastalık direnci ile ilgili genler de mevcut olabilir. EIN3, etilen tepkilerine aracılık etmede önemli bir rol oynayan bitkiye özgü bir transkripsiyon faktörüdür. Bitki savunma yanıtı, NBS-LRR proteinlerinin aşağı akışında yer alan etilen, SA ve JA dahil olmak

üzere birçok sinyal molekülünü indükler. Bu nedenle, hem etilen yolunun hem de NBS-LRR genlerinin, ascochyta yanmasına karşı direnç sağlamada rol oynayabileceği muhtemeldir (Mandeep vd., 2017: 12).

Mandeep ve ark., (2017: 12) genetik analizi sonucunda nohut genomunda 121 NBS-LRR geni tespit etti. NBS-LRR genleri sekiz farklı sınıfa ayrıldı. Ascochyta yanıklığı direnci için bilinen Q TL'lerle birlikte lokalizasyonlarına ve ekspresyon profillerine dayanarak ascochyta yanık enfeksiyonuna yanıt olarak potansiyel olarak dahil olan NBS-LRR genlerini belirledi. Nohutta NBS-LRR genlerinin hastalık direnci ile ilişkisini doğrulamak için ileri fonksiyonel çalışmalara kaynak sağlandı.



2. MATERYAL VE METOD

2.1 Bitki Materyalleri

Geçitkuşığı Tarımsal Araştırma Enstitüsünden (Eskişehir, Türkiye) 38 çeşit/melez nohut bitkisi yaprağı sağlanmıştır (Tablo 2. 1) .

Elde edilen bitki örneği sıvı azotta öğütüldükten sonra DNA izolasyonu için hazır hale getirildi. Kullanılana kadar -20 °C’de saklandı.



Şekil 2.1. Eskişehir Geçitkuşığı tarımsal araştırma enstitüsü Nohut çeşit/melez tarla görüntüsü

Tablo 2.1. Örnek alınan 38 çeşit/melez bitki materyali

Çeşit/Melez Adı	Orjin	Dayanıklılık ve Hassaslık Durumu
1-FLIP97-90C	19-MB-1	Dayanıklı
2-FLIP98-31C	19-MB-2	Bilinmiyor
3- Azkan	19-MB-3	Bilinmiyor
4-(4)CA9783088C//FLIP91-4C/CANITEZ-87-3E	19-MB-4	Bilinmiyor
5-ILC-3279	19-MB-5	Bilinmiyor
6-ICC-3996	19-MB-6	Bilinmiyor
7-ICC-12004	19-MB-7	Bilinmiyor
8-FLIP97-122C//91-149C/FLIP86-110C	19-MB-8	Bilinmiyor
9-FLIP97-90C/FLIP97-125C	19-MB-9	Bilinmiyor
10-FLIP09-7C	19-MB-10	Dayanıklı
11- Sel 01TH74102	19-MB-17	Hassas
12- JG 74 (ICC 6098) Fusarium	19-MB-18	Bilinmiyor
13-WR315 (ICC8933) Fusarium Race1 ve 3 tolerant	19-MB-19	
14- Canitez	19-MB-23	Hassas
15- Kır.-Noh.	19-MB-24	Hassas
16- Işık-05	19-MB-25	Hassas
17- Hisar	19-MB-26	Bilinmiyor
18- Çakır	19-MB-27	Bilinmiyor
19-Akça	19-MB-28	Bilinmiyor
20- Sarı-98	19-MB-37	Bilinmiyor
21-Meksika Nohudu (Aslan uzun havza/ Samsun)	19-MB-38	Hassas
22-Yeşilova	19-MB-39	Hassas
23-Tavas	19-MB-40	Hassas
24-FLIP 97-32C	19-MB-41	Hassas
25- FLIP99-6C	19-MB-42	Bilinmiyor
26-FLIP99-12C	19-MB-43	Bilinmiyor
27-FLIP98-90C/FLIP97-122C	19-MB-44	Bilinmiyor
28-KIR.NOH./4N-1142-4//FLIP97-90C-19E	19-MB-45	Bilinmiyor
29-FLIP97-74C/FLIP98-177C	19-MB-46	Bilinmiyor
30-FLIP97-107C//FLIP91-14C//FLIP90-124C/3/FLIP98-177C	19-MB-47	Bilinmiyor
31-FLIP97-32-C-2E/FLIP97-90C	19-MB-48	Bilinmiyor
32-FLIP98-151C/FLIP91-149C//FLIP91-75C/3/FLIP98-177C	19-MB-49	Bilinmiyor
33-FLIP97-90C/3/KIR:NOH.//FLIP97-127C/FLIP90-132C	19-MB-50	Bilinmiyor
34-FLIP97-90C/FLIP00-6C	19-MB-52	Hassas
35-BG-212(Kabuli)	19-MB-56	Bilinmiyor
36-CPS-1	19-MB-30	Hassas
37-16-NBVD	--	Dayanıklı
38-16-NBVD-15	--	Dayanıklı

2.2 DNA İzolasyonu

–Spin kolonuna 40 µl aktivasyon tamponu (Buffer P) eklendi ve spin kolonuna lizat karışımını ekleyene kadar oda ısısında tutuldu. 100 mg ıslak veya 20 mg kuru öğütülmüş/parçalanmış (un haline getirilmiş) bitki veya mantar materyalini 2 ml eppendorf tüpüne ekleyip, materyalin dipte toplanması için kısa bir santrifüj yapıldı. Tüpe 400 µl Lyse P (bitki, alg, liken) veya Lyse F (fungi) eklendi. Materyali tampon içinde homojen olarak dağılacak şekilde yavaşça alt üst edildi.

–3 µl RNase A ve 10 µl Proteinase K ekleyin. 65°C su banyosunda örnekleri 30 dak. inkübe edildi. İnkübasyon sırasında tüpleri belli aralıklarla yavaşça alt üst yaparak karıştırıldı. 130 µl Buffer AC eklendi, yavaşça alt üst ettikten sonra 5 dak. buzda bekletildi. 2 ml’lik tüler içindeki lizatı 10 dak. 15000 (veya 14 000) g’de santrifüjlendi. 400 µl süpernatant’ı yeni bir tüpe dikkatlice aktarıldı.

–350 µl Buffer Sol P eklendi. %96’lık etanolden 250 µl eklendi Tüpü birkaç kez alt üst yaparak karıştırıldı. 1 dak. 14 000 (veya 12 000) g’de santrifüj yapıldı. Süpernatant’ın 600 µl sini toplama tüpünün içindeki spin kolonuna eklendi. 1 dak. 14 000 (veya 12 000) g’de santrifüj yapıldı.

–Spin kolonu alıp toplama tüpündeki sıvıyı boşalttıktan sonra tekrar spin kolonunu toplama tüpüne yerleştirildi. Kalan süpernatant’ı da spin kolonuna ekleyerek 1 dak. 14 000 (veya 12 000) g’de santrifüjlendi. Spin kolonu alıp toplama tüpündeki sıvıyı boşalttıktan sonra tekrar spin kolonunu toplama tüpüne yerleştirildi. Spin kolonuna 500 µl Buffer Wash PX eklendi ve 1 dak. 14 000 (veya 12 000) g’de santrifüjlendi.

–Spin kolonu alıp toplama tüpündeki sıvıyı boşalttıktan sonra tekrar spin kolonunu toplama tüpüne yerleştirildi. Spin kolonuna 500 µl Buffer Wash PX ekleyin ve 2 dak. 14 000 (veya 12 000) g’de santrifüjlendi. Spin kolonunu alındı ve 1,5/2 ml’lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. 50-150 µl Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) kolonun tam ortasına eklendi. Oda ısısında 2-3 dak. inkübe edildi. 1 dak. 14 000 (veya 11 000) g’de santrifüjlendi. Kolonu atıp toplama tüpündeki DNA’yı 2-8°C’de saklandı.

İzole edilen DNA örneklerinin Nanodrop özellikli spektrofotometre de miktar ve kalite tayinleri gerçekleştirilmiştir. Daha sonra elde edilen DNA ekstratı PZR deneylerinde kalıp olarak kullanılmıştır.

2.3 Özgöl Belirteç (Marker) Tasarımı

Mandeep ve arkadaşları (2017: 11-12) çalışmada elde ettikleri *Ascochyta* yanıklığı direnci için bilinen Q TL'lerle birlikte lokalizasyonlarını ve ekspresyon profillerine dayanarak *Ascochyta* yanık enfeksiyonuna yanıt için potansiyel olarak dahil olan NBS-LRR genlerini belirledi. Nohutta NBS-LRR genlerinin hastalık direnci ile ilişkisini doğrulamak için ileri fonksiyonel çalışmalara kaynak sağladı.

- Çalışmada kaynak lokalizasyonları temel alarak NCBI veri tabanında yapılan tarama sonucunda nohut bitkisi için antraknoz hastalığına karşı direnç geni olabilecek NBS-LRR gen ailesi üyelerinin 43 adet complete (tam) CDS (kodlanan dizi) bilgisi elde edilmiş ve nükleotit dizileri fasta formatı olarak kaydedilmiştir.
- CDS dizilerinin tamamı MEGA 10.1.8 programı kullanılarak kendi aralarında dizi hizalaması yapılmış (Şekil 2. 2) ve Maximum Parsimony yöntemiyle benzerlik dendrogramı çizilmiştir.
- Dendrogramda benzerlik durumuna göre oluşan gruplar arasında, yüksek oranda benzerlik gösteren 14 farklı grup belirlenmiş ve bu gruplara ait dizilerin yüksek oranda benzerlik göstermeleri nedeniyle, her bir grubu temsil eden korunmuş diziler kullanılarak birer forward (ileri) ve reverse (geri) primer tasarlanmıştır.
- Primer tasarımında her bir primerin baz sayısı, %GC oranı, DNA kalıbına oturma ısısı (annealing temperature), hairpin, self-dimer, heterodimer, miss-match analizleri IDT web sitesindeki primer calculator software (<https://eu.idtdna.com/>) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve PZR sonucunda oluşacak ürün boyutları hesaplanmıştır (Tablo 2.3).

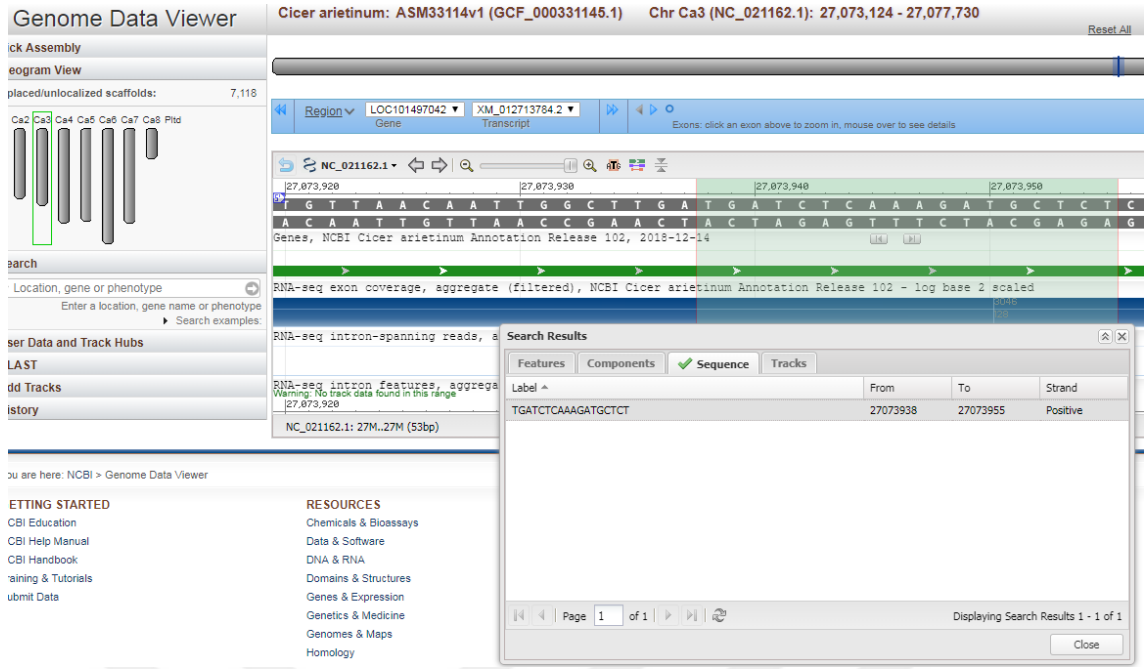
Species/Abbrv	
1. CC-NBS-LRR_LOC101492550	C T A A T G A G A G T T T G G T C A A A C A G G T T G T G A G T G A A T G T C A A A G G C T T C C A T T G G C
2. At1g50180_LOC101497121	A G A T G G A G A A A T T G G G A A G G G A A A T G G T T G G A A G A T G T G G A G G T T T A C C T C T A G C
3. At3g14460_LOC101504229	T C - T T G A A A A A A T T G G C A A A G A G A T T G T T A G A A A A T G T A A G G G A T T G C C T T T A G C
4. At3g14460_LOC101504401	T C - T C G A A A A A A T T G G G A A A G A G A T T G T T A G A A A A T G T A A G G G A T T G C C T A T A G C
5. At3g14460_LOC101504943	T C - T C G G A A A A A T T G G C A G A G A G A T T G T T A G A A A A T G T A A G G G A T T G C C T T T A G C
6. At3g14460_LOC101505696	T C - T C G A A A A A A T T G G C A A A G A G A T T G T T A G A A A A T G T A A G G G A T T G C C T T T A G C
7. At3g14460_LOC101514528	G T - T G A A G G A G A T T G G T A A A A G A T A A C T G G A A A A T G C A A A G G A T T A C C T C T A G C
8. At4g27190_like_LOC101496761	G T G A - - A A G A T G T A G C A A T T C A A G T T G C C C A A A A G T G T T C A G G T T T G C C T C T T A G
9. At5g05400_LOC101497997_variant_X1	T T G G - - A T G G T G T G C C A C A A A A A G T T T G C C T T G A A T G T A A A G G A C T A C C T A T A G C
10. At5g05400_LOC101497997_variant_X5	T T G G - - A T G G T G T G C C A C A A A A A G T T T G C C T T G A A T G T A A A G G A C T A C C T A T A G C
11. At5g05400_LOC101506740	T T G G - - A T G G T G T A C C A C A A A A A C T T T G C A A T G A A T G T A A G G G A C T A C C T A T A G C
12. LAZ5_LOC101499439_variant_X2	A G T A C T A T A A T C T A T C A A A G A A G A T T G G T A G A T T A T A C T A A A G G C A T T C C A T T A G T
13. LAZ5_LOC101499941	A G T A C T A T A A T C T A T C A A A G A A G A T T G G T A G A T T A T G C C A A A G G A A T T C C A T T A G T
14. RGA1_LOC101494964	C T - T G T C - G C A A T A G G C A A G G A G A T C G T A A A G A A G T G T G G G G A T T G C C T C T T G C
15. RGA2_LOC101498365	T C - T C G T G G A G A T T G G A A A A G A A A T T G T G A A A A A T G T C A A G G A G T T C C A C T A G C
16. RGA3_LOC101495199	G T - T G A T C G A G A T T G G T G A A G A A A T T G T G C A A A A A T G T G G A G G G C T T C C T T T G G C
17. RGA3_LOC101496073	G T - T G A T C G A G A T T G G A A A G A A A A T T G T G C A A A A A T G T G G A G G G C T T C C T T T G G C
18. RGA4_LOC101489480	C T - T G T G - G T A A T A G G A A G G A G A T A A T A A A A A A T G T G G G G G A G T G C C T C T T G C
19. RGA4_LOC101490582	G T - T G T T A G C T A A G G A A A G G A C A T T G T T A A G A A A T G T G C T G G A A T T C C C T T G C
20. RML1A_LOC101503346	A T T A T C A T G A T T T G T C C A A A G A A G G T G G T C A A G T A T G C T C A A G G A A T T C C A A T T G T
21. RML1A_like_LOC101498509	G A T A T G A A T A T C T A T C A A A C G A G C A A T C G G C T A T T G C A G A G G C A A T C C T T T G G C
22. RPM1_LOC101492653	A A C T T G A G G A A A T G T C G A A T G A A A T T G T T A A A A A A T G T G G A G G G T T G C A C T G G C
23. RPM1_LOC101497108	A A G T T G A A G G A T T A T G T T C T C A A A T T T T G A A A G C G T G T G G T G G T T T A C C A C T A G G
24. RPM1_LOC101497442	A T C T A G A A G A T A T A T C T A T G A A A T T G T T A G G A A G T G T A A G G G T T T A C C A C T A G C
25. RPM1_LOC101505222	A G C T C A A A G A T A T A T C T G A A G A A A T C G T T C A A A A T G C G A G G G G T T G C C G C T T G C
26. RPM1_like_LOC101493526	A A C T T G A G G A A A T G T C A A T G A A A T G G T T C A A A A A T G T G G A G G G T T G C C T T T G G C
27. RPM1_LOC101504665	A T C T T G A A G A A G T T T G T A A G A A T A T C T T A A A A T T G T G G A G G G T T G C C T T A G C
28. RPP2B_like_LOC101505313	G T T T T G C T G A C C T T T C T A G A G A T G T T G T T A A G T A C T C T G G G G G A T T G C C A C T A G C
29. RPS2_like_LOC101512529_variant_X1	A T T A - - A G C C G G T A G C G A T G A A A G T G T C G A A A A A T T G T G C T G G T T A C C C C T T T T
30. RPS2_like_LOC101512529_variant_X4	A T T A - - A G C C G G T A G C G A T G A A A G T G T C G A A A A A T T G T G C T G G T T A C C C C T T T T
31. RPP8_like_protein_3_LOC101512690	A G T T T G A G A A T C T T G C T A A G G A G A T T G T G G T G A A A T G T G A A G G T T T G C C A C T T G C
32. RPP13_like_protein_1_LOC101494471	G T G T A G A A A A A G T T G G A A G A G A A A T A G T T A A A A A G T G C A A A G G A T T G C C T T T G G C
33. RPP13_like_protein_1_LOC101497042	T C - T C G A A A A A A T T G G C A A G A A A A T T G T T A G A A A A T G T A A G G G A T T G C C T T T A G C
34. RPP13_like_protein_1_LOC101500214	A T C T A G A A G A T A T A T C T A T G A A A T T G T T A G G A A G T G C A A A A A G T G C G G T G G A T T G C C A T A G C
35. RPP13_like_protein_1_LOC101501665	G C C T A G A A G C G A T T T G C A G G A A G A T T G C C A A A A A G T G T T G C G G A T T G C C A A T A G C
36. RPP13_like_protein_1_LOC101502658	A T C T A G A A G C A A T T G G C A A G A A G A T T G C A A A A A A G T G T G G T G G A T T G C C C A T A G C
37. RPP13_like_protein_1_LOC101515540	A T C T A G A A G C A A T T G G C A A G A A G A T T G C A A A A A A G T G C G G T G G A T T G C C T A T A G C
38. RPP13_like_protein_2_LOC101495647	G A A G A A T T A T G T T T C C A A G G A C A T C G - - A G T G C T T G T T G A A G A G A T T C T T A A T
39. Enhanced_Disease_resistance_2_LOC101490237	G T T C A G C A T C T A T A T C G A G A T T G A T C T G A A G G G T T G G G G T G T G A G T T A C A T A C C G T
40. probable_At4g27220_LOC101493495	T T G G - - A T A G T G T G C C A C G G A G A A T C T G C A A T G A A T G T A A G G G A C T T C C C A T A A C
41. probable_At4g27220_LOC105851576	T T G A - - A A G A T G T A C C A T T T C A A A T T T C G C A A A A G T G T G G A G G T T T G C C T C T T A A
42. probable_At4g33300_LOC101492877	C T A A T C A G A A T T T A G T C A A A C A G G T T G T G A A T G A G T G T G G A A A G C T T C C A C T A G C
43. probable_At5g66900_LOC101505949	C T G A T A A A A A T C T T G T C A T G A G A T A G T G A G A G G T T G T A A G G G T T C A C C A T T A G C

Şekil 2.2. NCBI gen bankası veri tabanında tanımlanmış NBS-LRR direnç gen dizilerinin MEGA 10.1.8 analiz programı ile hizalanması (At3g14460 Gene ID: 101511364, Gene ID: 101514528, Gene ID: 101504401, Gene ID: 101504943, Gene ID: 101504229, Gene ID: 101505696. CC-NBS-LRR Gene ID: 101492550. At1g50180 Gene ID: 101497121. At4g27190-like Gene ID: 101496761. At5g05400 Gene ID: 101497997, Gene ID: 101506740. LAZ5 Gene ID: 101499439, Gene ID: 101499941. RGA1 Gene ID: 101494964, RGA2 Gene ID: 101498365, RGA3 Gene ID: 101496073, Gene ID: 101495199. RGA4 GeneID: 101489480, GeneID: 101490582. RML1A GeneID: 101503346. RML1A-like GeneID: 101498509. RPM1 GeneID: 101492653, GeneID: 101497442, GeneID: 101505222, GeneID: 101504665, GeneID: 101497108. RPM1-like GeneID: 101493526. RPP2B-like GeneID: 101505313. RPS2-like GeneID: 101512529. RPP8_like GeneID: 101512690. RPP13_like GeneID: 101494471, GeneID: 101497042, GeneID: 101500214, GeneID: 101501665, GeneID: 101502658, GeneID: 101515540, GeneID: 101495647. ENHANCED DISEASE RESISTANCE 2 GeneID: 101490237. probable_At4g27220 GeneID: 101493495, GeneID: 105851576. At4g33300 GeneID: 101492877. probable_At5g66900 GeneID: 101505949).

Tablo 2.2. Tasarlanan özgül primerler ve nükleotid dizileri

Primer Adı	Primer Dizisi (5'- 3')	Ürün Boyutu(bp)
At3g/RPP13-Like1 Grubu	Forward: TGATCTCAAAGATGCTCT Reverse: ACTTACGAACCATATCCC	~143-146
RPP13-Like 1 Grubu	Forward: GATTGTTGGTCTTTACTC Reverse: TTCTGCCATCCACAAC	~363-365
RGA 3	Forward: GTGTGTTCAATGATAAGAG Reverse: AAGGAAGCCCTCCACAT	~500-503
RGA 1	Forward: CAGAGGGCTTGCTTAGTG Reverse: AATGTCTTTGAACTTGTTAC	326
RGA 2	Forward: GCCACTTCTTTTCTACCT Reverse: TTCCTATTACACTTGATGC	201
RGA 4 (RGA4_LOC101490582)	Forward: AGGCCAATAATCATCAAG Reverse: GCCATCACTTTTCTTTTC	115
RPM1 Grubu	Forward: GGKTTTRCCWYTDGSAATTGT Reverse: ACAAAYCCTTCDGCHATCCA	~331-391
RML1A (RML1A_LOC101503346)	Forward: ATGCAAATGAATCAAGGA Reverse: CCCTAAAGCTAACAAAAAC	223
LAZ5 grubu (LOC101499439_variant_X2)	Forward: TGCTTATTTCAAAACCAAG Reverse: TTCGTGACAAAGCCTTAA	195
RPP2B Like	Forward: ATGGCTTCCTTCAGTTCT Reverse: AACAACAACCTCCAGCTACT	171
CC-NBS-LRR	Forward: CCGAACAACCTCCTCAATT Reverse: TTTCCATTTTCTTTGCTAA	207
At4g27190_like	Forward: TGGAGTGGGCAAGACAAC Reverse: CCGGCAATAGTCTCTTCA	171
RPS2 Like (X4)	Forward: GTGGCTTTACCTGTGCTG Reverse: CGATCTCTTCACCGTTCC	151
At5g05400_LOC101497997 grubu (X5)	Forward: ATGTCTTCTTTGCGTTAA Reverse: TTCCACTGGTTTCTCAAT	136

- NBS-LRR direnç gen dizilerine özgül tasarlanmış 14 primer çiftinin her biri, nohut bitkisine ait tüm genom dizisi üzerinde oturma bölgeleri belirlenmek üzere NCBI gen bankası Genome Data Viewer programı analiz edilmiş ve ilgili gen/gen grubunun intron içerip içermediği teyit edilmiştir (Şekil 2. 3).



Şekil 2.3. NCBI gen bankası Genome Data Viewer programı ile NBS-LRR direnç gen dizilerinin intron içermediğinin teyit edilmesi. 14 primer çiftinden temsilen At3g/RPP13-Like1 Grubu Forward primeri için yapılan analiz sonucunun gösterimi.

2.4 PZR Yöntemiyle Çoğaltımı

Direnç genlerinin tespitinde spesifik belirteçler (marker) olan primerler kullanılarak PZR reaksiyonları gerçekleştirildi. Aşağıda kullanılan mikrosatellitler ve dizileri bulunmaktadır.

PZR protokolü aşamaları:

1. Primerler 300µl ticari su ile çözündürüldü ve stok primer çözeltisi hazırlandı.
2. 2.5µl stok primer çözeltisinden alınıp 100µl'ye dH₂O ile tamamlandı ve primer çalışma solüsyonu hazırlandı.
3. -20°C'de saklandı.
4. 25µl toplam reaksiyon hacmi ile, genomik DNA'dan spesifik primerler için PZR amplifikasyonu gerçekleştirildi.

Tablo 2.3. 38 nohut çeşidi için hazırlanan 25µl PZR MİX protokolü

Bileşen	Miktar
H ₂ O	11.8µl
Buffer(10X)	2.5µl
MgCl ₂	1.5µl
dNTP (dATP, dCTP, dGTP ve dTTP)	2µl
F-primer	2.5µl
R-primer	2.5µl
DNA kalıbı	2µl
Taq Polimeraz	0.2µl

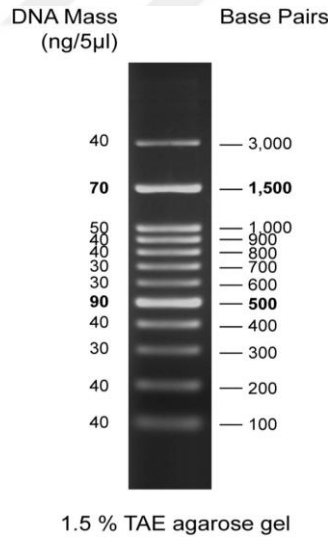
Amplifikasyonlar, aşağıdaki şekilde programlanan bir Techne TC Plus termoksikleyinde (Techne Inc.) gerçekleştirildi: 1 döngü; 94°C'de 3dk (ön denaturasyon); 35 döngü; 94°C'de 1dk 50-60°C'de (her bir primer için farklı oturma ısıları) 1dk, 72°C'de 2dk, 1 döngü; 72°C'de 7dk (final uzama) şeklinde gerçekleştirilmiştir.

2.5 AgaroZ Jel Elektroferezi ve Fotoğraflama

PZR ürünleri %1.4'lük agaroz yoğunluğunda yatay elektroferez kullanılarak yürütüldü. 1.4gr agaroz tartılıp 100ml 0.5X'lik TBE solüsyonu içerisine konulduktan sonra mikrodalga fırında kaynatıldı ve uygun sıcaklığa geldiğinde içerisine 2.4µl etidyum bromide eklendi. Taraklar yerleştirilip jel tablaya döküldü. AgaroZ jel katılaştıktan sonra tarakları çıkartılarak 5µl PZR ürünü 1µl loading dye olmak üzere kuyucuklara toplam 6µl yüklendi. İlk kuyucuğa DNA ladder (100bp plus) 3µl yüklendi. Elektroferez tankında tampon olarak 0.5X'lik TBE kullanıldı. PZR ürünler 85V'da 1 saat 30dk yürütüldükten sonra UV transillüminatör altında görüntüldü.

Tablo 2.4. TBE tampon içeriği

5X'lik TBE (1lt)	
Stok solüsyonlar	Miktar
Tris base	54gr
Borik asit	27.5gr
EDTA(0.5M)	1ml



Şekil 2.4. 100bp plus DNA ladder marker

3. BULGULAR

3.1. DNA Miktar ve Kaliteleri

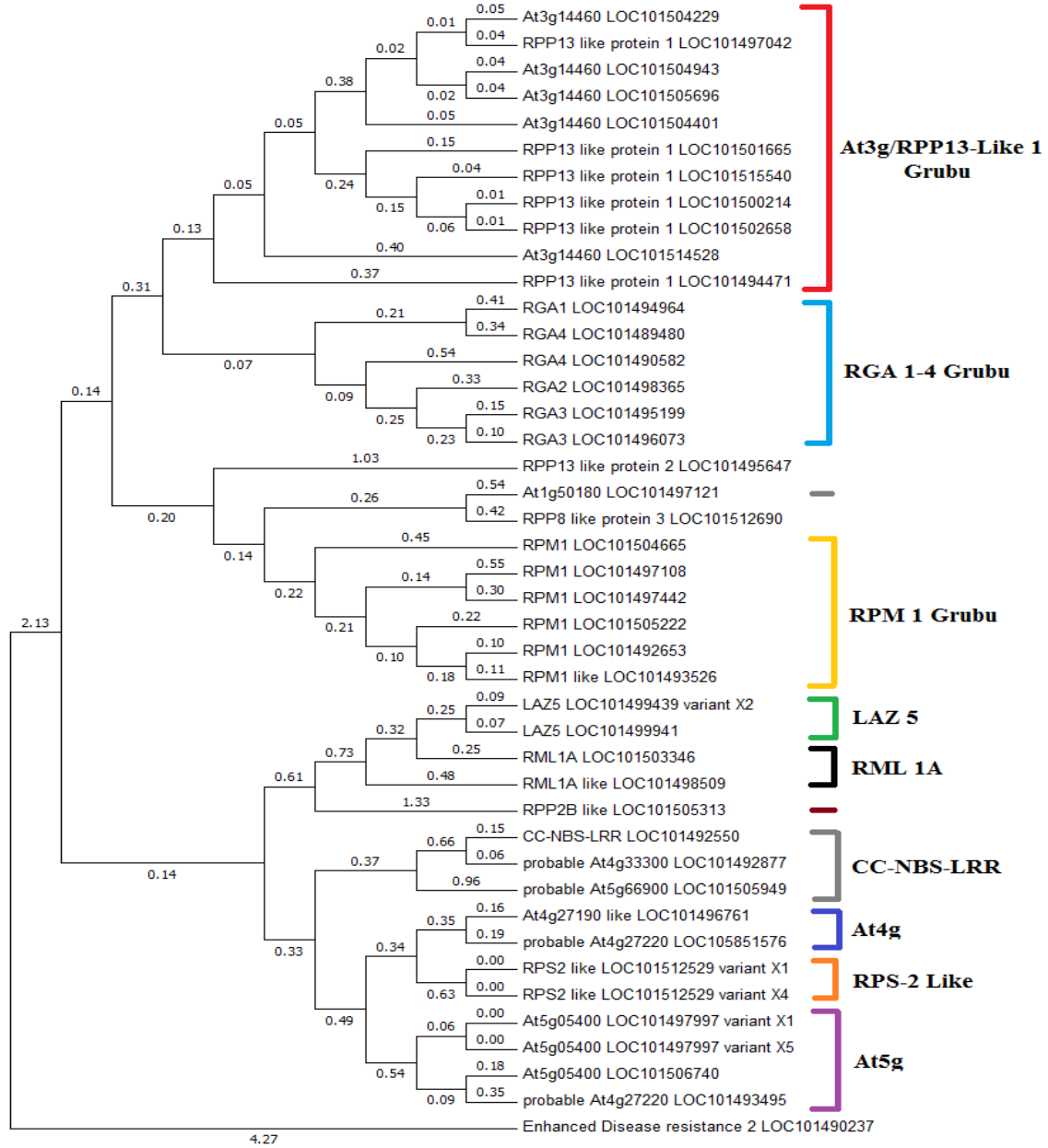
Çalışma materyali olarak kullanılan 38 nohut çeşit ve hattının DNA izolasyonu sonucunda spektrofotometrik yöntemle miktar ve kalite tayinleri gerçekleştirilmiştir

Tablo 3.1. Nohut çeşitlerinden izole edilmiş genomik DNA'ların miktar ve saflık ölçüm sonuçları.

Nohut çeşit/hat	Saflık (260/280 nm)	DNA miktarı (Ng/μl)
1-FLIP97-90C	1,43	24,90
2-FLIP98-31C	1,91	32,67
3- Azkan	1,90	21,78
4-(4)CA978 3088C//FLIP91-4C/CANITEZ-87-3E	1,85	21,85
5-ILC-3279	1,95	36,19
6-ICC-3996	1,93	23,66
7-ICC-12004	1,96	31,69
8-FLIP97-122C//91-149C/FLIP86-110C	1,90	27,81
9-FLIP97-90C/FLIP97-125C	2,13	24,33
10-FLIP09-7C	1,83	33,15
11- Sel 01TH74102	2,17	24,32
12- JG 74 (ICC 6098) Fusarium	2,02	18,14
13-WR315 (ICC8933) Fusarium Race1 ve 3 tolerant	1,92	28,44
14- Canitez	1,93	26,36
15- Kır.-Noh.	1,94	29,57
16- Işık-05	2,03	30,02
17- Hisar	2,18	28,19
18- Çakır	1,94	51,18
19-Akça	2,08	33,26
20- Sarı-98	2,15	30,94
21-Meksika Nohudu (Aslan uzun havza/ Samsun)	1,96	32,15
22-Yeşilova	1,95	35,80
23-Tavas	1,99	27,99
24-FLIP 97-32C	2,08	30,67
25- FLIP99-6C	2,10	28,75
26-FLIP99-12C	1,97	40,67
27-FLIP98-90C/FLIP97-122C	1,98	43,29
28-KIR.NOH./4N-1142-4//FLIP97-90C-19E	2,08	45,14
29-FLIP97-74C/FLIP98-177C	2,18	40,90
30-FLIP97-107C//FLIP91-14C//FLIP90-124C/3/FLIP98-177C	2,05	37,41
31-FLIP97-32-C-2E/FLIP97-90C	2,20	31,88
32-FLIP98-151C/FLIP91-149C//FLIP91-75C/3/FLIP98-177C	1,83	41,86
33-FLIP97-90C/3/KIR:NOH./FLIP97-127C/FLIP90-132C	2,08	44,28
34-FLIP97-90C/FLIP00-6C	1,94	38,28
35-BG-212(Kabuli)	2,11	35,67
36-CPS-1	2,20	36,73
37-16-NBVD	2,09	35,26
38-16-NBVD-15	1,86	29,44

3. 2. Gen Dizilerinin Benzerlik Analizi

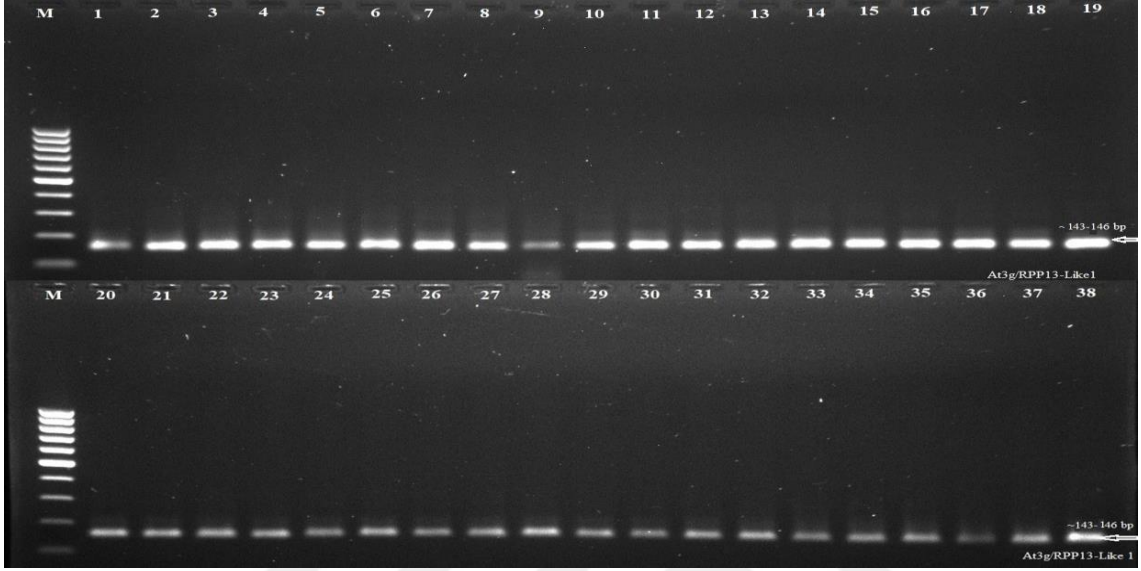
NCBI gen bankası veri tabanında antraknoz direnci için tanımlanan genlere ait dizilerin MEGA 10.1.8 programı kullanılarak Maximum Parsimony yöntemiyle oluşturulan benzerlik dendrogramı oluşturulmuştur (Şekil 3. 1.). Dendrogramda, nohutta antraknoza karşı direnç durumu için farklı isimler altında tanımlanan NBS-LRR genlerinin dizi benzerliklerine göre gruplandıkları görülmüştür.



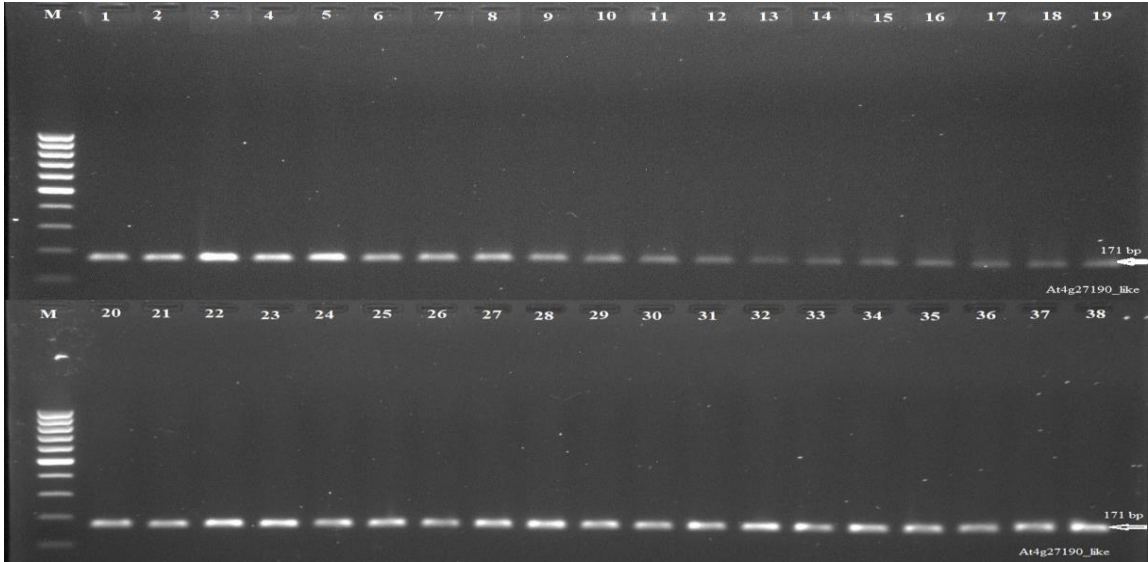
Şekil 3.1. NCBI gen bankası veri tabanında antraknoz direnci için tanımlanan genlerin dizi benzerliklerine göre dendrogramı ve gen grupları.

3. 3. PZR Ürünlerinin Analizi

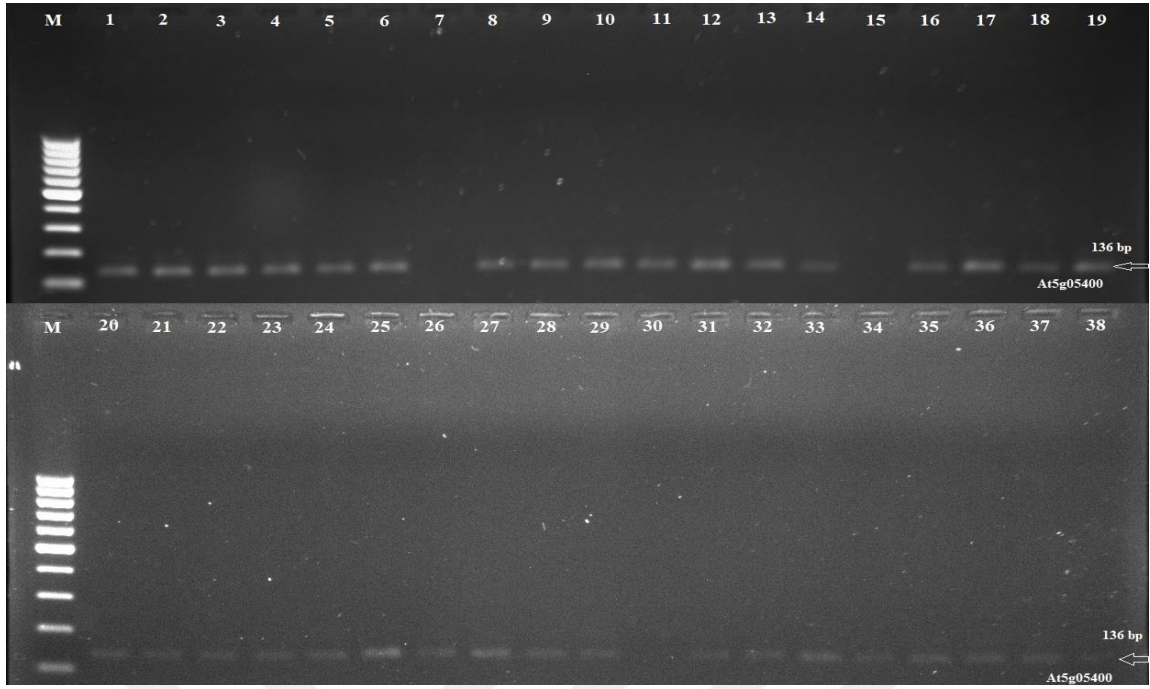
NBS-LRR direnç genlerini tespit etmede kullanılmak üzere tasarlanan 14 çift primer ile gerçekleştirilen PZR amplifikasyon ürünlerinin % 1.4'lük agaroz jelde yürütülmesi sonucu oluşan özgül bantlar ve jel görüntüleri şekil 3. 2.-3. 15.'de gösterilmektedir.



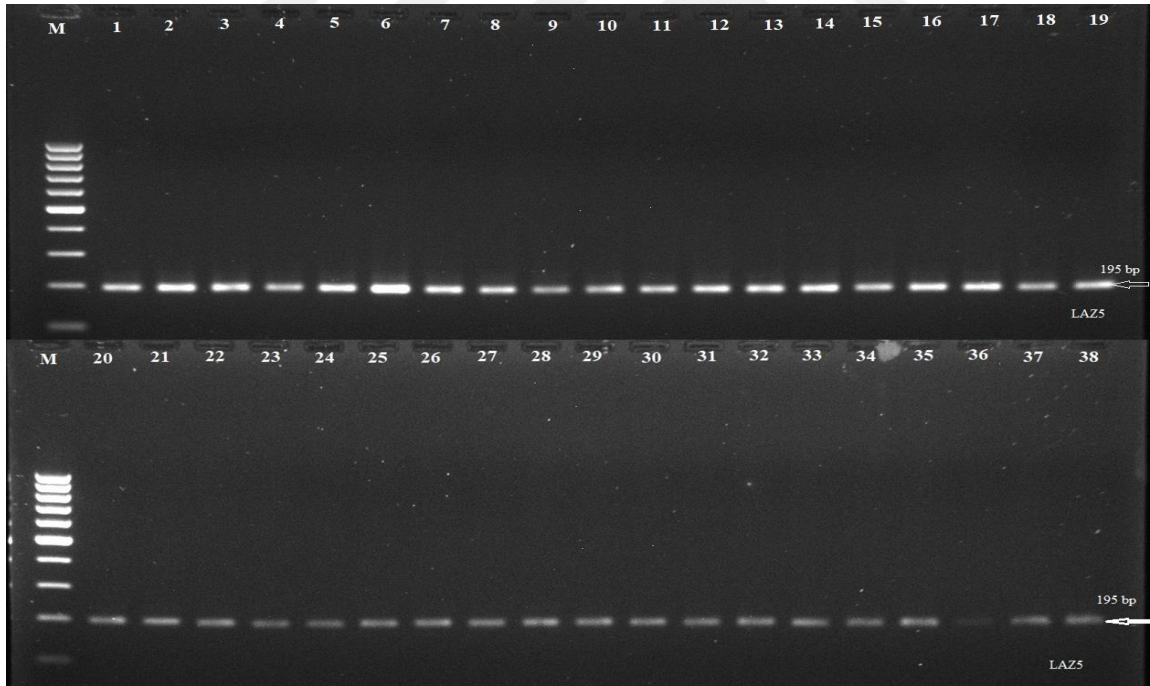
Şekil 3.2. At3g/RPP13-like primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M: DNA Markörü 100bp plus DNA ladder



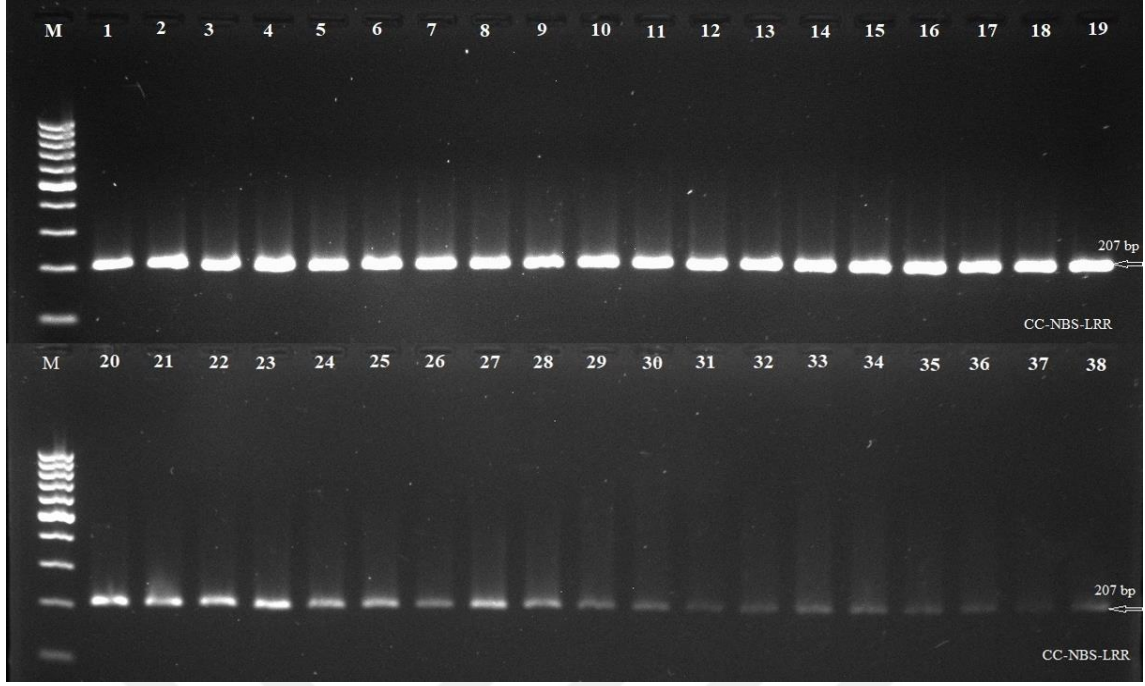
Şekil 3.3. At4g27190_like primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M: DNA Markörü 100bp plus DNA ladder



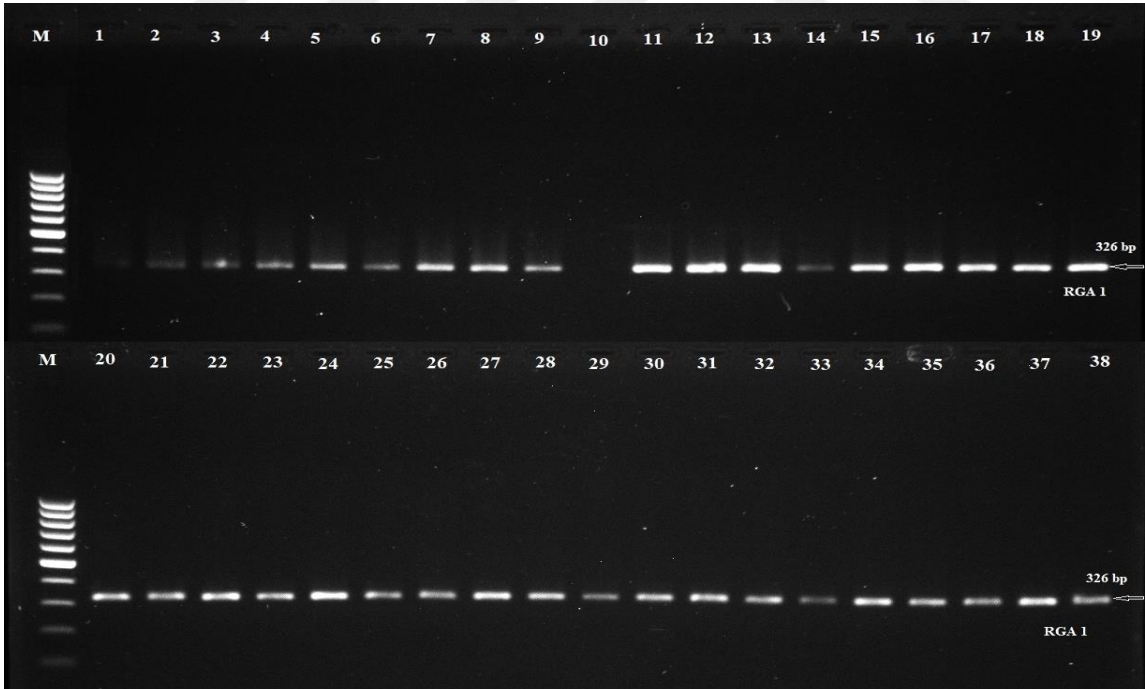
Şekil 3.4. At5g05400 primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M: DNA Markörü 100bp plus DNA ladder



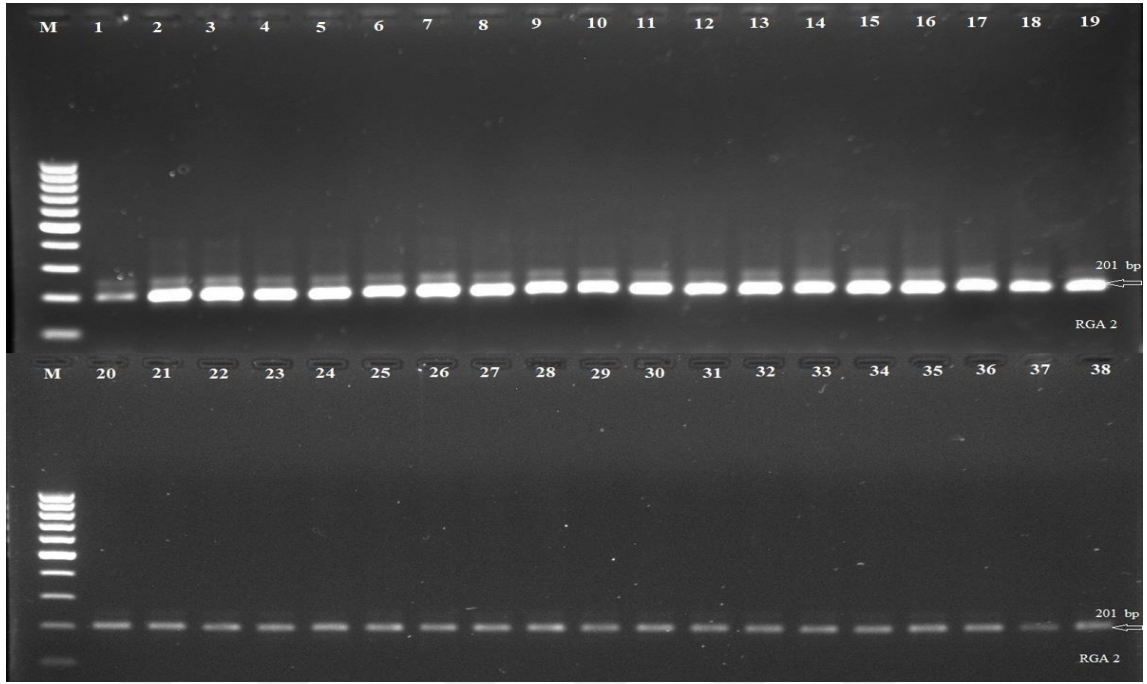
Şekil 3.5. LAZ5 primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M: DNA Markörü 100bp plus DNA ladder



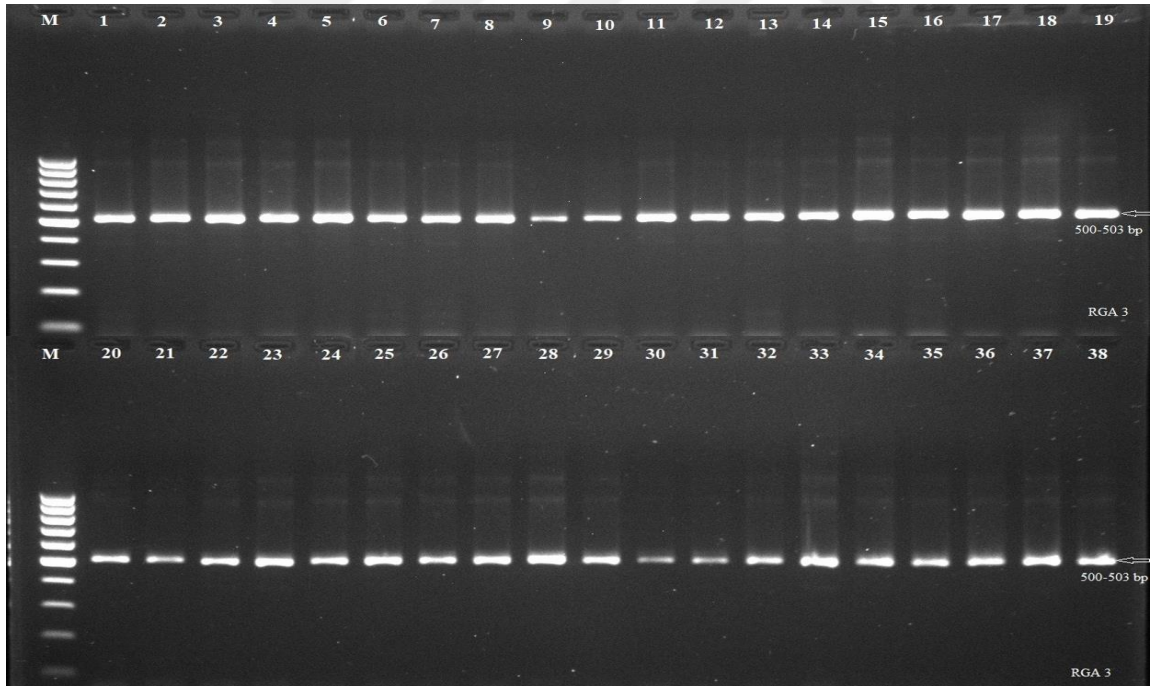
Şekil 3.6. CC-NBS-LRR primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M: DNA Markörü 100bp plus DNA ladder



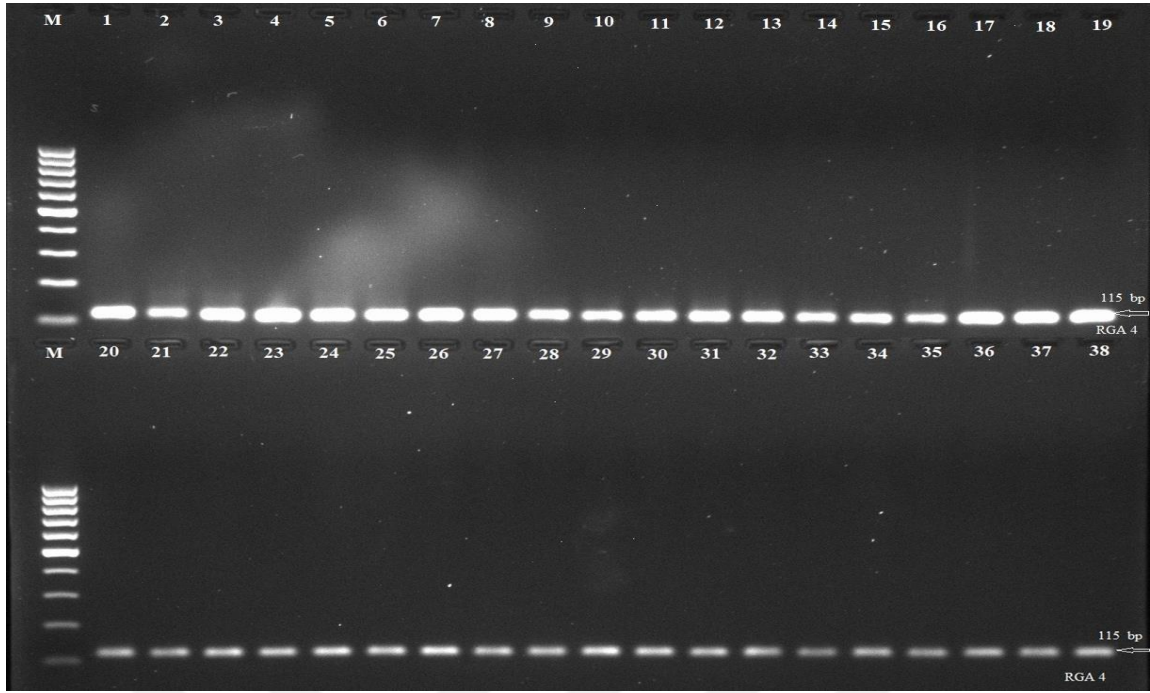
Şekil 3.7. RGA 1 primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M: DNA Markörü 100bp plus DNA ladder



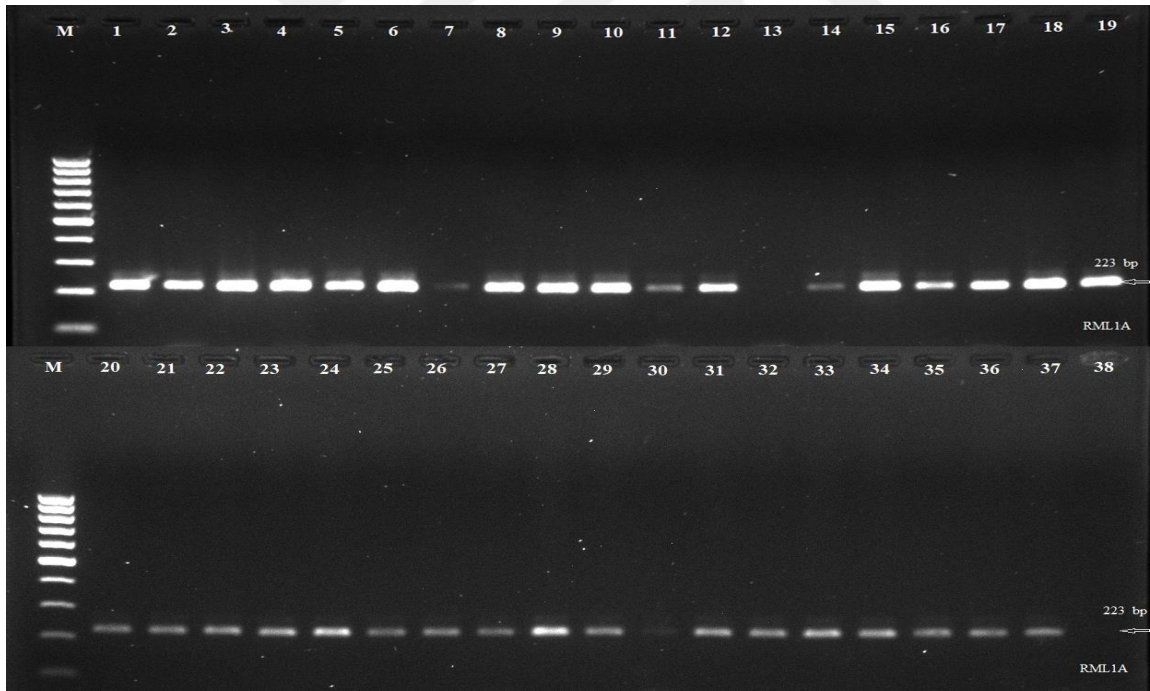
Şekil 3.8. RGA 2 primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M: DNA Markörü 100bp plus DNA ladder



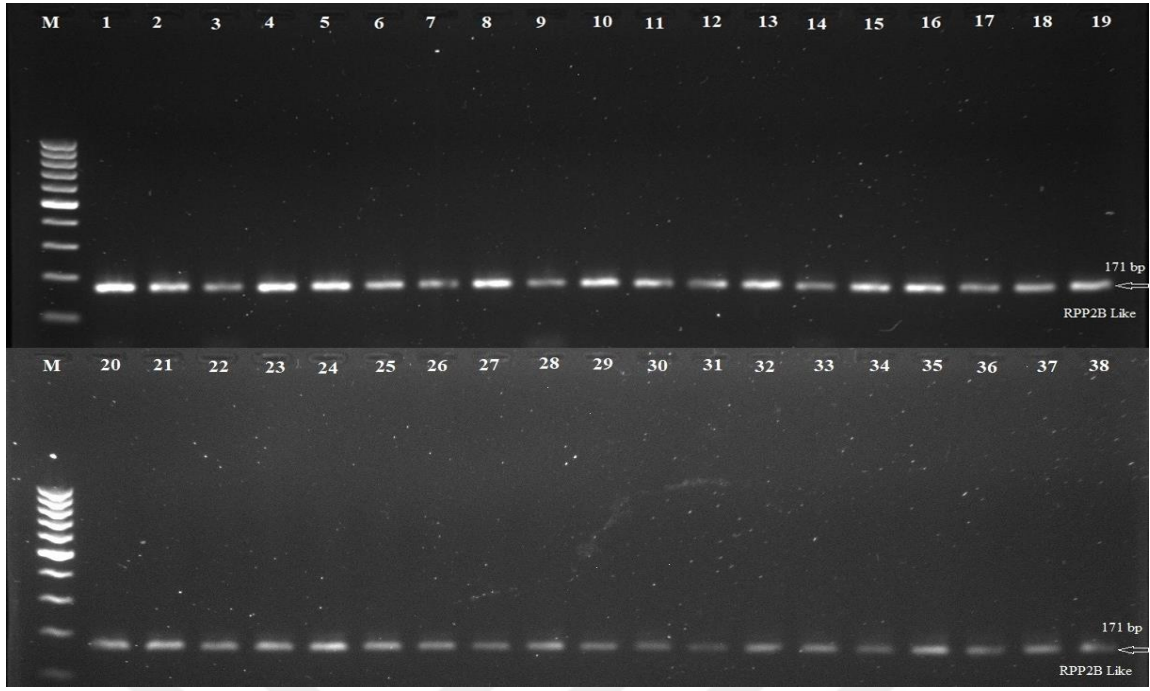
Şekil 3.9. RGA 3 primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M: DNA Markörü 100bp plus DNA ladder



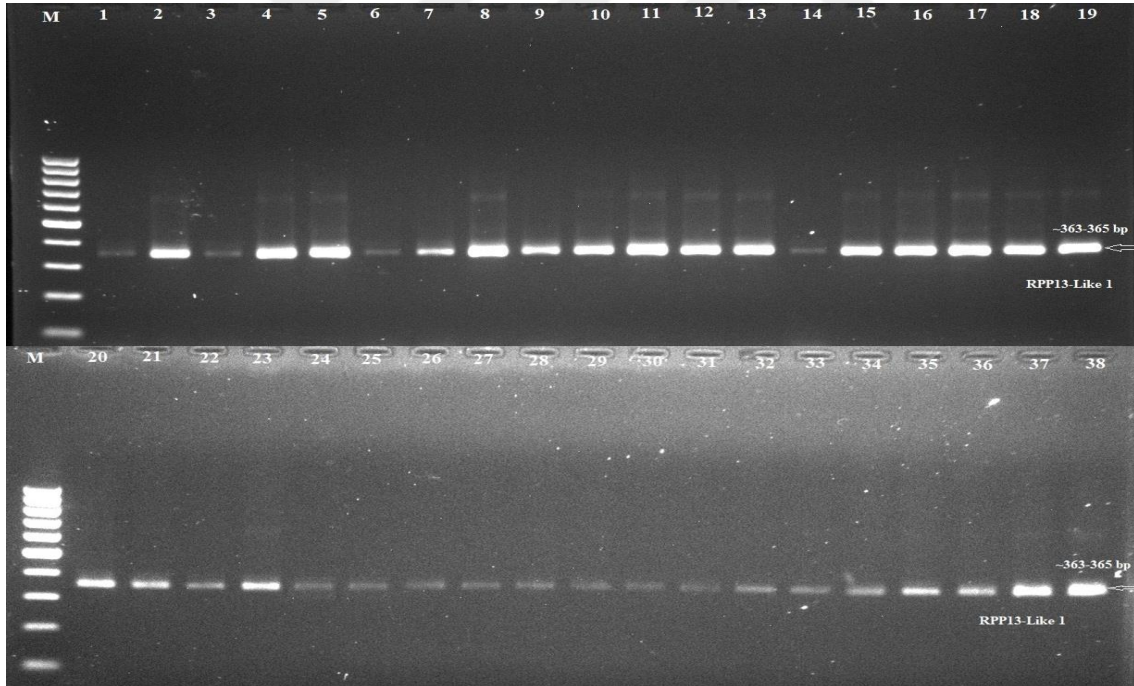
Şekil 3.10. RGA 4 primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M: DNA Markörü 100bp plus DNA ladder



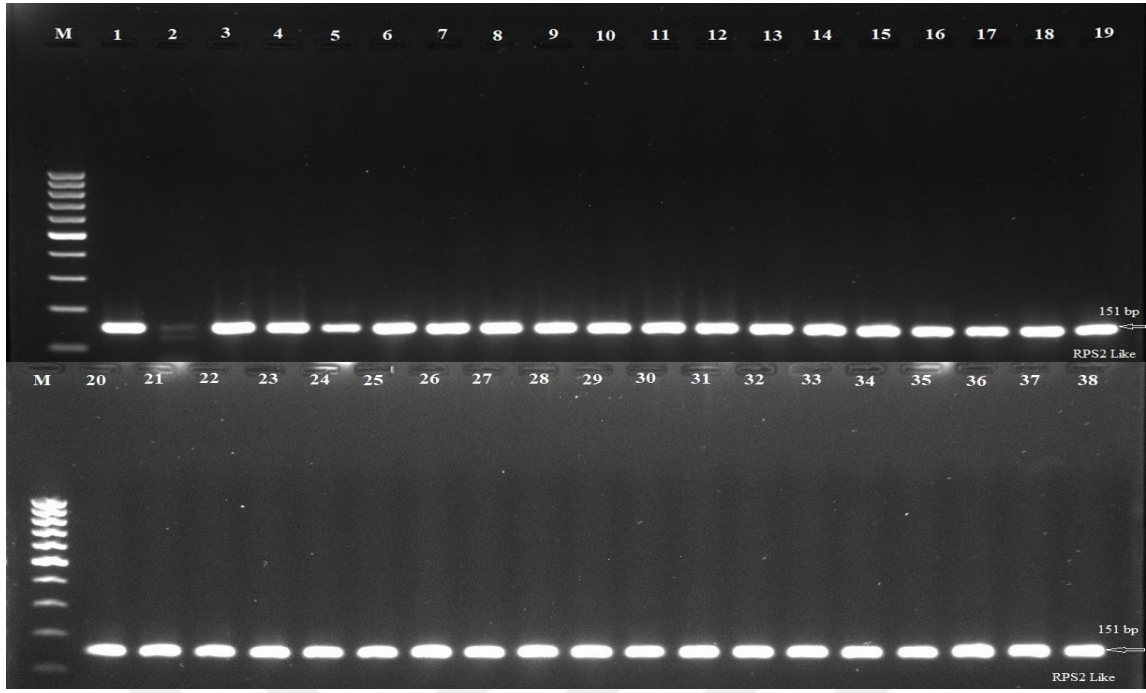
Şekil 3.11. RML1A primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M: DNA Markörü 100bp plus DNA ladder



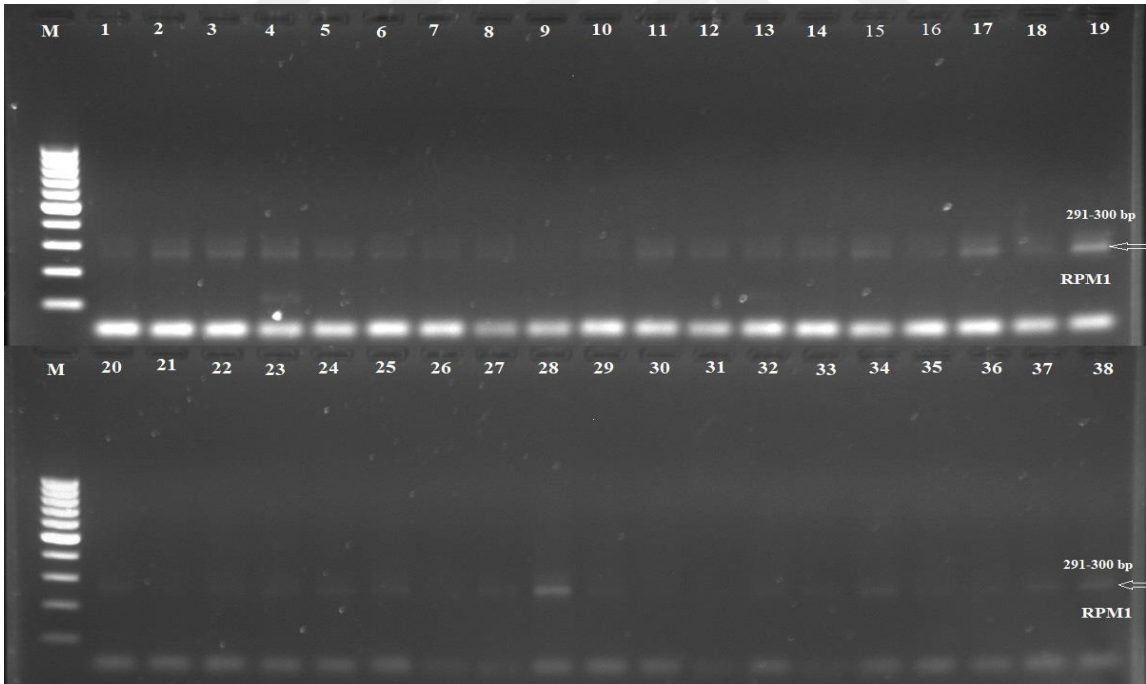
Şekil 3.12. RPP2B primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M: DNA Markörü 100bp plus DNA ladder



Şekil 3.13. RPP13-Like 1 primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M: DNA Markörü 100bp plus DNA ladder



Şekil 3.14. RPS2 Like primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M: DNA Markörü 100bp plus DNA ladder



Şekil 3.15. RPM1 primeri ile kurulan PZR deneyinin jel görüntüsü. M: DNA Markörü 100bp plus DNA ladder

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Nohut, dünya üzerinde insanlar için önemli besin değerleri bakımından zengin baklagillerden biridir. Bitki-bazlı diyet proteininin ana kaynaklarından. Dünya üzerinde giderek artan nüfusun, hayvansal-bazlı proteinlerin pahalı olması, yaşanan çevre sorunları gibi nedenlerden dolayı da talep giderek artmaktadır (Bayrak, 2010; Gan vd., 2006: 1-122).

Nohut yetiştiriciliğinde en büyük problemlerden biri de şüphesiz ki *Ascochyta rabiei* patojeninin neden olduğu *Ascochyta* yanıklığı (antraknoz yanıklığı) hastalığıdır. Bu hastalığın bulunduğu tarlalar ciddi boyutlarda ürün kaybı yaşamaktadır. Hastalığın ortaya çıkması için az miktarda inokulum yeterli olmakla birlikte çeşitli yollarla yayılabilmektedir. Yakın çevredeki tarlalarda gözlenmesi ciddi risk oluşturmaktadır. Hastalığın yayılması kısa zamanda gerçekleşmektedir (Atasagun, 2009; Tabanlı, 2016: 63-10).

Bitkiler patojenleri algılamak ve bunlara yanıt vermek için sadece iki katmanlı hücre-otonom bağışıklık sistemini kullanır. Çoğu patojen enfeksiyonu direnci, plazma zarı üzerinde lokalize bitki desen tanıma reseptörleri (PRR'ler) tarafından patojene bağlı moleküler modellerin (PAMP'ler) tanınmasıyla aktif olan bitki bazal savunma tepkisinin birinci tabakası tarafından gerçekleştirilir. Bazı patojenler ise, konakçı bazal savunmayı baskılamak için efektör proteinleri bitki hücrelerine ileterek ilk bariyeri atlatabilir. Patojenler, patojen efektör proteinin varlığını tanıyan ve aşağı yönde aktive eden bitki hastalığına direnç geni (R-genleri) tarafından kodlanan hücre içi reseptörler ve bu reseptörlerin aracılık ettiği efektörlerle tetiklenen bağışıklık mekanizması (ETI) olan ikinci savunma tabakası ile karşılaşır (Mandeep vd., 2017; Millan vd., 2003: 11-374).

Bitki de bulunan protein alanı organizasyonlarına ve bitki hücresindeki lokalizasyonlarına göre çeşitli R-gen sınıfları tanımlanmış ve sınıflandırılmıştır. Merkezi Nükleotid Bağlanma Bölgesi (NBS) ve karboksil / C-terminal Lösin Zengin Tekrar (LRR) bölgesinden oluşan kodlama proteinleri R-gen sınıfını en fazla içerenlerdir ve NBS-LRR genleri olarak isimlendirilir. Bitki NBS-LRR patojen efektör varlığını algılayabilen hücre içi reseptörlerdir (Mandeep vd., 2017: 11). Bu nedenle bu çalışmada antraknoza direnç için tanımlanan NBS-LRR genleri hedeflenmiştir.

NBS-LRR genlerinden ekspres edilen proteinler, patojen efektör proteinlerine bağlanarak veya konakçıdaki patojen efektör hedef proteinlerinde herhangi bir değişikliği tanıyarak dolaylı olarak işlev alır. Patojen büyümesini sınırlayan diğer biyokimyasal

değişiklikler de savunma mekanizmasında görev alır. Böylelikle aşırı duyarlı tepkiyle sonuçlanan çoklu savunma sinyali transdüksiyonlarını aktive eder. Merkezi NBS alanı (NB-ARC alanı), ATP ve GTP fosforillenmesi ve defosforillenmesi için gerekli olan sıralı korunmuş motiflerden oluşur. NBS bölgesinden sonra birkaç ardışık LRR bölgesi patojen efektör moleküllerine karşı tanınma spesifikliği sağladığı bilinmektedir (Mandeep vd., 2017 ; Millan vd., 2003: 11-374).

Bitki NBS-LRR genleri, amino / N-terminal alanının varlığı veya yokluğuyla ilişkili olarak iki alt sınıfa ayrılabilir. Birinci alt sınıf, N-terminal konumunda *Drosophila* Toll ve INTERLEUKIN1 benzeri reseptör (TIR) alanını kapsar ve TIR-NBS-LRR (TNL) proteinlerini içerir. Diğer alt sınıf ise Coiled-coil (CC) alanını kapsar ve CC-NBS-LRR (CNL) proteinlerini içerir. Zinc Finger veya RPW8 alanı gibi diğer alanlar da N-terminal konumunda bulunur (Mandeep vd., 2017; Millan vd., 2003: 11-374). CC-NBS-LRR alt sınıfını için tasarlanan ve test edilen özgül markör mevcuttur (Şekil 3.2). *Ascochyta* yanıklığına karşı genetik direnç karmaşık bir özelliktir ve çevresel koşullardan oldukça etkilenir. Günümüze kadar, çeşitli genetik arka planlarda LG-2, LG-3, LG-4, LG-6 ve LG-8 şeklinde adlandırılan ve *ascochyta* yanıklığına karşı direnç için birkaç Q TL'yi (niceliksel özellik lokusunu) tanımlayan bağlantı grupları (LG) bulunmuştur. Bu Q TL'lerin çoğu SSR işaretleri ile etiketlenmiştir, ancak direncin altında yatan genler hala bilinmemektedir. Şimdiye kadar etilen yolağından iki aday gen CaETR-1 (EIN-4 benzeri) ve etilen duyarsız 3-benzeri gen (EIN-3); LG4 üzerindeki *Ascochyta* yanma direnci QTLAR1 lokusunda ve LG2'deki QTLAR3 lokusunda tanımlanmıştır. Bu çalışmalar, etilen yolunun nohutta *Ascochyta* yanma direncine karşı olası katılımını önermektedir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, *Ascochyta rabiei* enfeksiyonuna yanıt olarak savunma ile ilgili olarak 15 genin ekspresyon profili araştırılmış ve incelenen 10 nohut genotipi arasında 6 farklı eksprese edilmiş genin var olduğu tespit edilmiştir. *Ascochyta* yanıklığı ile ilişkili Q TL'lere direnç gösteren aday genlerin belirlenmesi, direnç mekanizmasının anlaşılmasına yardımcı olacağı ve marker destekli seçim kullanılarak dirençli çeşitlerin geliştirilmesine katkı sağlayacağı öngörülmektedir (Mandeep vd., 2017; Millan vd., 2003: 11-374).

Bugün için hastalıklarla savaşın en kesin ve uygun yolu dayanıklı çeşitler geliştirilerek bunların üretilmesidir. Çeşit ıslahında yüksek verim, yüksek kalite, kışa ve kurağa ve hastalıklara karşı dayanıklılık önemlidir. Bu nedenle yeni dayanıklı çeşitler geliştirilmeli veya yüksek verimli mevcut çeşitlere direnç genleri (R-gen) aktarılmalıdır (Furan vd., 2009: 1).

Moleküler markörler, DNA'nın aktif bölgeleri olan genlerden veya kodlama fonksiyonu bulunmayan DNA dizilerinden geliştirilebilir. Moleküler DNA markörlerinin bitki ıslahına entegrasyonu, arzulanan genlerin çeşitler veya türler arasındaki hareketinin hızlandırmasının yanı sıra akraba yabancı türlerden yeni genlerin aktarılmasına izin vermiş ve çok gen tarafından idare edilen karmaşık karakterlerin incelenmesini mümkün kılmaktadır. Genlerin klonlanmasını kolaylaştırmakta ve birbiriyle çaprazlanmayan bitkiler arasındaki genetik ilişkiyi açığa çıkarmaktadır (Yıldırım A., 2001).

SSR ve SCAR belirteçleri lokus'a spesifiktir ve farklı genetik arka planlarda tanımlanabilirler, böylece bireylerin ayrışma popülasyonlarında yanlış sınıflandırma şansını azaltırlar. R-genleri varlık yokluk tespiti için en ideal belirteçlerdir (Iruela vd., 2006: 279).

Nohutta antraknoz hastalığıyla mücadelede, daha önce gerçekleştirilen bazı önemli çalışmalar bulunmaktadır. Ülkemizde Toker ve Çancı (2003:280) ile Atasagun (2009: 64-66)'un gerçekleştirdiği araştırmalar, ıslah çalışmalarında dayanıklı çeşitlerin tespiti ve yetiştirilmesine yön veren çalışmalar arasında yer almaktadır.

Udupa ve Baum'un gerçekleştirdiği bir çalışmada mikrosatellit belirteçleri kullanarak nohutta *Ascochyta* yanıklığına karşı patotip spesifik direncin genetik diseksiyonu yapılarak direnç gen lokusları (büyük bir lokusu ar1 ve iki bağımsız resesif majör lokusu olan ar2b ve ar2a), haritalaması yapılmıştır (Udupa ve Baum., 2003: 1200).

Yine daha önce yapılan bir çalışmada, *Ascochyta* yanıklığına karşı direnç için iki kantitatif özellik lokusu (QTLAR1 ve QTLAR2) saptanmıştır. QTLAR2 olarak adlandırılan QTL, yoğun bir markör kümesiyle genomik bir bölgede haritalanmıştır. Dört SCAR markörü geliştirilmiştir ve bunlardan üçü iki STMS markörü ile birlikte markör kümesinde mevcuttur (Iruela vd., 2006: 280).

Tabanlı'nın gerçekleştirdiği bir çalışmada, nohutta antraknoz hastalığına karşı dayanıklı/hassas bireyleri belirlemede RAPD ve ISSR primerleri ile STMS yöntemi primerleri karşılaştırılmış ve STMS primerlerinin hastalığa karşı dayanıklılığı daha yüksek oranlarda tespit ettiği öne sürülmüştür (Tabanlı, 2016: 41-44).

Bu çalışmada da Mandeep ve arkadaşlarının (2017: 11-12) yapmış olduğu çalışmada tespit edilen birkaç niceliksel özellik lokusu (QTL) kendi aralarında sınıflandırılarak 14 farklı özgül marker tasarlanmıştır (Tablo 2. 2). Bu markerler kullanılarak yapılan PZR yöntemiyle

amplifikasyon sonucunda elde edilen jel görüntülerine bakılarak R-genleri varlık-yokluk tespiti tablosu oluşturulmuştur (Tablo 4. 1).

Tablo 4.1. Tasarlanan ve kullanılan 14 adet moleküler belirteçler ile 38 Çeşit/Hat Nohut üzerinde yapılan PZR yöntemiyle çoğaltım sonucu jel görüntülerine bakılarak R-genleri varlık-yokluk tespiti (+: varlık, -: yokluk).

		Tasarlanan ve kullanılan moleküler belirteçler													
		1-At3g/RPPP13-Like1	2-RPP13-Like 1	3-RGA 3	4-RGA 1	5-RGA 2	6-RGA4 (RGA4_LOC101490582)	7-RPM1	8-RML1A (RML1A_LOC101503346)	9-LAZ5 (LOC101499439_variant_X2)	10-RPP2B Like	11-CC-NBS-LRR	12-At4g27190_like	13-RPS2Like (X4)	14-At5g05400_LOC101497997 (X5)
38 Çeşit/melez isimleri	1-FLIP97-90C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2-FLIP98-31C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3- Azkan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4-(4)CA978 3088C//FLIP91- 4C/CANITEZ-87-3E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5-ILC-3279	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6-ICC-3996	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	7-ICC-12004	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	8-FLIP97-122C//91- 149C/FLIP86-110C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	9-FLIP97-90C/FLIP97- 125C	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

Tablo 4. 1. 'in devamı

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
38 Çeşit/melez isimleri	10-FLIP09-7C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	11- Sel 01TH74102	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	12- JG 74 (ICC 6098) Fusarium	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	13-WR315 (ICC8933) Fusarium Race1 ve 3 tolerant	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	14- Camtez	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	15- Kır.-Noh.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	16- Işık-05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	17- Hisar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	18- Çakır	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	19-Akça	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	20- Sarı-98	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	21-Meksika Nohudu (Aslan uzun havza/ Samsun)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	22-Yeşilova	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	23-Tavas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	24-FLIP 97-32C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	25- FLIP99-6C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	26-FLIP99-12C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	27-FLIP98-90C/FLIP97-122C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	28-KIR.NOH./4N-1142-4//FLIP97-90C-19E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tablo 4. 1. ‘ in devamı

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
38 Çeşit/melez isimleri	29-FLIP97-74C/FLIP98-177C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	30-FLIP97-107C//FLIP91-14C//FLIP90-124C/3/FLIP98-177C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	31-FLIP97-32-C-2E/FLIP97-90C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	32-FLIP98-151C/FLIP91-149C//FLIP91-75C/3/FLIP98-177C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	33-FLIP97-90C/3/KIR:NOH./FLIP97-127C/FLIP90-132C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	34-FLIP97-90C/FLIP00-6C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	35-BG-212(Kabuli)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	36-CPS-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	37-16-NBVD	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	38-16-NBVD-15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Bu çalışmada, At3g/RPP13-Like1 Grubu ile kurulan PZR reaksiyonu sonucunda elde edilen jel görüntüsünde 343-346 bp boyutunda, At4g27190_like için 171 bp, LAZ5 grubu için (LOC101499439_variant_X2) için 195 bp, CC-NBS-LRR için 207 bp, RGA 2 için 201 bp, RGA 3 için ~500-503 bp, RGA 4 (RGA4_LOC101490582) için 115 bp, RPS2 Like (X4) için 151 bp ve RPP13-Like 1 Grubu için ~363-365 bp boyutlarında ürün beklenmektedir. Bu dokuz primer ile kurulan PZR reaksiyonları sonucu elde edilen jel görüntülerinde 38 çeşit/hat nohutun hepsinde bu beklenen ürün boyutlarında bantlar görülmüştür. Bu nedenle dayanıklı birey FLIP97-90C ve hassas birey Sel 01TH74102 çeşitleri başta olmak üzere diğer bireylerde R-geni belirleyici yönde farklılık gözlenmemiştir. Şekil 3. 12’de RPP2B-like geni için elde edilen ürünler incelendiğinde, özellikle ilk 19 örnekteki ürün boyutlarının aynı olmadığı ve yaklaşık 5-15 nükleotidlik farklara sahip oldukları gözlenmiştir. Bu durum, primerlerin oturma bölgelerinde olası SNP (tek nükleotid polimorfizmi)’lerin olabileceğini ve farklı büyüklüklerde ürünlere neden olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmada kullanılan nohut çeşit/melezlerin içinde hem hassas hem de dayanıklı örneklerin bulunması göz önüne alındığında, bu gen için tanımlanmış markörün tüm örneklerde ürün vermesi; direnç geninin

inaktif mutant formlarının da bulunabileceğini ve hastalığa karşı hassasiyete neden olabileceğini göstermektedir. Çalışmada tasarlanan diğer markörlere göre, RPP2B-like geni için tasarlanan markörün ürün boyutu sabit olup dendrogramda yüksek oranda benzerlik gösteren üç geni temsil etmektedir. Bu nedenle RPP2B-like geni için PZR ile elde edilen ürün boyutlarındaki yaklaşık 5-15 nükleotidlik farkının SNP'ler nedeniyle olduğu tahmin edilmektedir. Dendrogramda daha fazla sayıda büyük grubu temsil eden markör primerlerinin ürün boyutlarında olası değişiklikler Tablo 2.3'de verilmiştir.

RGA 1 primeri ile gerçekleştirilen PZR sonucu jel görüntüsündeki beklenen ürün boyutu 326 bp olup, dayanıklı FLIP09-7C(Kışlık Nohut) dışındaki tüm nohut örneklerinde bu ürün bandı bulunmaktadır.

RPM1 Grubu primeri ile gerçekleştirilen PZR sonucu jel görüntüsündeki ürün boyutu ~331-391 bp civarında olup, FLIP97-90C/FLIP97-125C, Meksika Nohudu (Aslan uzun havza/ Samsun), FLIP97-74C/FLIP98-177C, FLIP97-107C//FLIP91-14C//FLIP90-124C/3/FLIP98-177C, FLIP97-32-C-2E/FLIP97-90C, FLIP98 -151C/FLIP91-149C//FLIP91-75C/3/FLIP98-177C, FLIP97-90C/3/KIR:NOH.//FLIP97-127C/FLIP90-132C örneklerinde ürün bandı gözlenmemiştir. Diğer nohut örneklerinde ise ~331-391 bp arasında boyutunda ürün bandı gözlenmiştir. Meksika nohodu çeşidinin hassas birey olduğu bilinmekle birlikte, ürün bandının oluşmadığı diğer örneklerin tarladaki direnç durumunun henüz bilinmemesi; bu çalışmadan elde edilen veriler ile sonrasında yapılacak tarla çalışmalarıyla karşılaştırılmasında önemli bir kriter olacaktır.

RML1A primeri (RML1A_LOC101503346) primeri ile gerçekleştirilen PZR sonucu jel görüntüsündeki ürün boyutu 223 bp olup, WR315 (ICC8933) Fusarium Race1-3 tolerant ve 16-NBVD-15 örneklerinde ürün bandı gözlenmemiştir. Diğer bireylerde 223 bp boyutunda ürün bandı gözlenmiştir. 16-NBVD-15 çeşidi tarla verilerine göre dayanıklı olarak tanımlanmaktadır. Ancak, bu çalışmada RML1A için ürün bandı gözlenmemiştir. Bu durum, bu nohut örneği için RML1A geni dışında direnci sağlayan başka bir genin varlığını işaret etmektedir.

At5g05400_LOC101497997 grubu (X5) markörü primeri ile gerçekleştirilen PZR sonucu jel görüntüsündeki ürün boyutu 136 bp olup; ICC-12004, Kır.-Noh., FLIP97-107C//FLIP91-14C//FLIP90-124C/3/FLIP98-177C örneklerinde beklenen büyüklükte ürün bandı gözlenmemiştir. Diğer bireylerde 136 bp boyutunda ürün bandı gözlenmiştir. Kır.-Noh. çeşidinin tarla verilerine göre hassas olduğu bilinmekte olup, At5g05400 markör primeri ile

de ürün gözlenmemiştir. Ürün bandı görülmeyen diğer örneklerin ise tarladaki direnç durumları henüz bilinmemektedir. Bu çalışmada At5g05400 markör primeri elde edilen verilerin, dayanıklılık durumu bilinmeyen örnekler için daha sonra yapılacak tarla çalışmalarıyla karşılaştırılması gerekmektedir.

Dayanıklılık kalıtsal olarak; tek gen (monogenic), birkaç gen (oligogenic) ve çok gen (polygenic) tarafından yönetilmektedir. Hastalıklara karşı dayanıklılığın tek gen, birkaç gen ve çok gen tarafından yönetilmesinin bilinmesi ıslah çalışmaları için oldukça önemlidir. Tek gen tarafından yönetilen dayanıklılık ıslahı çalışmaları, diğerlerine göre basit ve sonucu kolaydır. Çok gen tarafından idare edilen dayanıklılıkta genomda birçok bölge etkili olduğundan ıslah çalışmaları oldukça zordur. Bu durumdaki genler kantitatif olarak ölçülebilmekte ve bunlar QTL olarak isimlendirilmektedir. Bitkilerdeki QTL üzerine çevre ve genler arası interaksiyonlar etkili olmaktadır. Bu bölgelerin her birinin çevre şartlarına etki dereceleri birbirlerinden farklı olmaktadır. Çevrenin etkisinin fazla olması bitkilerin dayanıklılık özelliklerini belirlemeyi güçleştirmektedir (Devran Z., 2003: 4).

Her bir direnç geninin Q TL'si göz önünde bulundurularak yapılan çalışmamızda, PZR ile elde edilen ürünlere ait jel görüntüleri incelendiğinde, tüm primer çiftler (markörler) için beklenen büyüklükte ürün bantları elde edilmiştir. Çalışma materyalleri olan nohut örnekleri arasında FLIP97-107C//FLIP91-14C//FLIP90-124C/3/FLIP98-177C, FLIP97-90C/FLIP97-125C, Meksika Nohudu (Aslan uzun havza/ Samsun), FLIP97-74C/FLIP98-177C, FLIP97-32-C-2E/FLIP97-90C, FLIP98 -151C/FLIP91-149C//FLIP91-75C/3/FLIP98-177C, Kır.-Noh. ve FLIP97-90C/3/KIR:NOH.//FLIP97-127C/FLIP90-132C ICC-12004 çeşitleri hassas birey sınıfında yer almaktadır. Ancak bu durum 38 çeşit/melez nohut örneği için hassas/ dayanıklı bireyleri tespit etmeye yönelik kesin bilgiler vermemektedir. Bunun nedeni antraknoz hastalığına karşı direnç genlerinin, birden fazla gen (çok gen) tarafından idare edilmesi durumudur. Bu yüzden, tanımlanan direnç gen veya gen gruplarının farklı kombinasyonlar da direnci sağladığı göz önüne alındığında, bazı direnç genlerinin özgül markörler ile PZR sonuçları pozitif olsa bile bitki, hastalığa direnç için gerekli gen kombinasyonunu sağlayamadığı için hassas olabilmektedir. Bu çalışmanın sonuçları, nohut antraknoz hastalığına karşı dirençte çok gen mekanizmasının varlığını net bir şekilde ortaya koymuştur. Çalışma kapsamında geliştirilen ve testleri yapılan özgül belirteçlerin yüksek oranlarda PZR verimliliğine sahip olduğu görülmüş, ürün özgüllüğü ve tekrarlanabilirliğinin de çok iyi olduğu tespit edilmiştir. Islah çalışmalarında ebeveyn olarak kullanılacak adayların direnç durumlarının moleküler markörler ile önceden tespit edilmesinde, bu çalışmada tasarlanan

özü markörlerin kombine olarak kullanılması mümkün olup, tarla verileriyle de desteklenerek uygulanması yararlı olacaktır. Bu çalışmanın sonuçları ve tasarlanan markörlerin gelecekte antraknoz hastalığına karşı etkin mücadeleye katkı sağlayacağı öngörülmektedir.



5. KAYNAKÇA

- Apaydın A., Aydın H., Akbaş H. R., Altın, N., Uzunoğulları, N., Yücel, S. ve Ozan, S.,** (2008). Zirai Mücadele Teknik Talimatları-CİLT III. Sebze Hastalıkları Bölümü, Nohut Entegre Mücadele Teknik Talimatı, Kılıç, vd., 2017 Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Araştırma ve Teknoloji Geliştirme Kampüsü İstanbul Yolu Üzeri, No:38,06171,Yenimahalle/ANKARA, Sayfa;58-60.
- Arıcı, Ş. E. ve Evsen, M. A.,** (2018). Nohut Antraknozu (*Ascochyta rabiei*)’nun Entegre Hastalık Yönetimi, Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Isparta.
- Atasagun, M.,** (2009). Konya İlinde Nohut Antraknozu (*Ascochyta Rabiei* (Pass) Labr.) ‘Nun Durumu Ve Mücadele Olanakları, Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Konya.
- Bayrak, H.,** (2010). Konya Ekolojisinde Tarımı Yapılan Yerel Nohut Popülasyonları Ve Çeşitlerin Tarımsal, Teknolojik Ve Besinsel Karakterlerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı, Konya.
- Çeker ,A.,** (2008). Türkiye’nin Bazı Bölgelerinden Toplanmış Nohut Genotiplerinin Moleküler Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana.
- Devran Z.,** (2003). Moleküler İşaretleyicilerin Dayanıklılık Islahında Kullanılması, Narenciye ve Seracılık Araştırma Enstitüsü, Antalya
- Doyle J.J., Doyle, J.L.,** (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, Phytochem, Bull, 11-15s.
- Gan, Y.T., Siddique K.H.M., MacLeod W.J., Jayakumar P.** (2006). Management options for minimizing the damage by ascochyta blight (*Ascochyta rabiei*) in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Agriculture and Agri-Food Canada, Airport Road East Gate #3, Swift Current, SK, Canada S9H3X2, Centre for Legumes in Mediterranean Agriculture (CLIMA), Faculty of Natural and Agricultural Sciences, The University of Western Australia, 35 Stirling Highway, Crawley, WA 6009, Australia, Department of Agriculture Western Australia, Lot 12 York Rd., Northam, WA 6401, Australia.
- Hari, D. U., Dwivedi, S. L., Baum, M., Varshney, R. K., Udupa, S. M., Gowda, David, C. LL., Singh, H.&S.,** (2008). Genetic structure, diversity, and allelic richness in composite collection and reference set in chickpea (*Cicer arietinum* L.), 16 October 2008, BMC Plant Biology
- Hasdemir, M. ve Terzi, D.,** (2015). Yemeklik Baklagiller. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Eğitim Yayın ve Yayınlar Dairesi Başkanlığı İvedik Caddesi Bankacılar Sokak No: 10 Yenimahalle/ANKARA
- Iruela, M., Rubio, J., Barro, F., Cubero, J.I., Millan, T. and Gil, J.,** (2006). Detection of two quantitative trait loci for resistance to ascochyta blight in an intra-specific cross of (*Cicer arietinum* L.): development of SCAR markers associated with resistance. Dpto. de Mejora y Agronomía, IFAPA, Co’rdoba, 14080 Co’rdoba, Spain, F. Barro Dpto de Agronomía y Mejora Genética Vegetal, IAS-CSIC, Co’rdoba, 14080 Co’rdoba, Spain, Dpto de Genética, ETSIAM, Co’rdoba, 14080 Co’rdoba, Spain.

Kılıç, T., Erdoğan, P., Taşkın, T., Serim, T., Ateş, E., Canpolat, S., Caner, Ö. K., Güven, B. ve Barış, A., (2017). Nohut Entegre Mücadele Teknik Talimatı. TC. Tarım ve Gıda Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Bitki Sağlığı Araştırmaları Daire Başkanlığı, Üniversiteler Mah. Dumlupınar Bulvarı, Eskişehir Yolu 10. Km Çankaya/ANKARA 06530 TÜRKİYE. Sayfa;15-17.

Mandeep, S. S., Amit, A. D. and Bunyamin, T. (2017). Genetic Analysis of NBS-LRR Gene Family in Chickpea and Their Expression Profiles in Response to Ascochyta Blight Infection, Department of Plant Sciences, College of Agriculture and Bioresources, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada.

Millan, T., Rubiob, J., Iruela, M., Daly, K., Cubero, J.I. and Gil J., (2003)Markers associated with Ascochyta blight resistance in chickpea and their potential in marker-assisted selection. Departamento de Genética, Universidad de Córdoba, Aptdo 3048, 14080 Córdoba, Spain , Departamento de Mejora y Agronomía, Centro de Investigación y Formación Agraria (CIFA), Aptdo 3092, 14080 Córdoba, Spain , Department of Field Crop and Plant Protection, Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie (INRAT), 2080 Ariana, Tunisia

Nene, Y. L. (1982). A Review of Ascochyta Blight of Chickpea, International Crops Research institute for the Semi-Arid Tropics, ICRISAT P.O., Patancheru 502 324, A.P., India, Tropical Pest Management 28(1): 61—70 3 Crown copyright.

Pande, S., Siddique, K. H. M., Kishore, G. K., Bayaa, B., Gaur, P. M., Gowda, C. L. L., Bretag, T. W. and Crouch, J. H. (2005). Ascochyta blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review of biology, pathogenicity, and disease management, International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India, Centre for Legumes in Mediterranean Agriculture, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, The University of Western Australia, 35 Stirling HWY, Crawley, WA 6009, Australia, International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, PO Box 5466, Aleppo, Syria, Department of Primary Industries, Private Bag 260, Horsham, Vic. 3401, Australia. Corresponding author. Email: s.pande@cgiar.org,Australian Journal of Agricultural Research, 56, 317–332

Rawal, V. and Navarro, D. K., eds. (2019). The Global Economy of Pulses. Rome, FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations)

Singh K.B. (1997). Chickpea(*Cicer arietinum* L.). International Center for Agricultural Research in Dry Areas (ICARDA), P.O. Box 5466, Aleppo, Syria.

Tabanlı, F., (2016).Ülkemizde Geliştirilen Tescilli Nohut (*Cicer arietinum* L.) Çeşitlerinde Ascochyta Yanıklığına Karşı Direncin Moleküler Belirteçler (STMS, RAPD, ISSR) ile Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, İstanbul.

Toker, C. and Çancı, H., (2003).Selection of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Genotypes for Resistance to Ascochyta Blight [*Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.], Yield and Yield Criteria Department of Field Crops, Faculty of Agriculture, Akdeniz University, 07070 Antalya – TURKEY.

Udupa, S. M., Baum, M. (2002). Genetic dissection of pathotype-specific resistance to ascochyta blight disease in chickpea (*Cicer arietinum* L.) using microsatellite markers. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), P.O. Box 5466, Aleppo, Syria.

Yıldırım, A. ve Kandemir, N., (2001). Genetik markörler ve analiz metodları. Bitki Bitoteknolojisi II-Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, S.Özcan, E.Gürel ve M.Babaoğlu (Derl.), Selçuk Üniversitesi Yayınları, Konya, , 334-363s.



ÖZ GEÇMİŞ

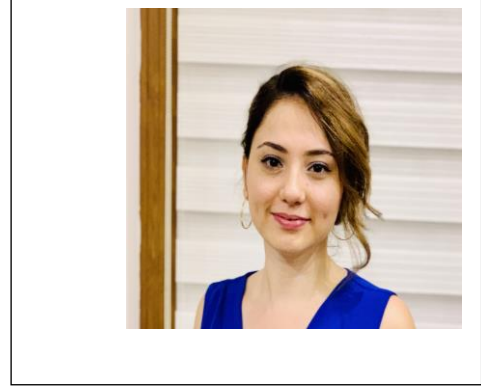
Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Burcu YANIK

Doğum Yeri ve Tarihi : Bakırköy/10.07.1994

İletişim

yanik_burcu@hotmail.com



Eğitim

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Fen Fakültesi,
Bilecik, Türkiye (2013-2017)

Kadriye Moroğlu Lisesi, İstanbul, TÜRKİYE(2008-2012)

Profesyonel İş Deneyimi

Staj: İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Çapa Hastanesi Tıbbi Biyoloji Bölümü Süre:
30 iş günü.

Bilecik Şeyh Edebali University Molecular Biology Laboratory (lisans stajı)

GRAZ University Molecular Biosciences and Biotechnology, AUSTRIA (Erasmus
Stajı): 60 gün

Dr. Hulusi Behçet Ortaokulu 2019-2020 Öğretim yılı Fen Bilimleri Öğretmeni

Akademik Projeler

Moleküler Markerler Kullanılarak On sekiz Buğday Çeşitinde Sarı (Stripe) Pasa Karşı
Bazı Direnç Genlerinin (Yr-1, Yr-5, Yr-10, Yr-18 ve Yr-29) Belirlenmesi

Nohut Antraknozu (Ascochyta Rabiei) Hastalığına Karşı Direnç Genlerinin
Belirlenmesi Ve Özgül Belirteçlerin Geliştirilmesi (Yüksek lisans çalışması)

Katınılan seminerler

Uluslararası Eğitim ve Bilim Araştırma Konferansı (ICRES) 28 Nisan - 1 Mayıs 2018, Marmaris, Türkiye, Poster sunumu(POX gen tabanlı markörler ile ondokuz yerli fasulye çeşitlerinde genetik çeşitliliğin karakterizasyonu).

Uluslararası Biyolojik Çeşitlilik ve Yenilebilir Yaban Türleri Sempozyumu, 2017, poster sunumu

2. Temel kök hücre eğitimi semineri, Ege Üniversitesi

1. Uluslararası Adli Biyoloji ve Genetik Kongresi, Ankara Üniversitesi

Kök Hücre ve Uygulamaları Sempozyumu, İstanbul Üniversitesi

Dil

Türkçe: Anadili

İngilizce: Okuma becerileri: Intermediate

Yazma becerileri: Intermediate

Sözel yetenekler: Intermediate

Yetenekler

Excel, Word, Power Point ve Tüm Microsoft Office Uygulamaları: Mükemmel

Afiş Tasarımı: Mükemmel

Akademik Makaleler: Mükemmel

Tarih: 30/09/2020