

Ekmeklik Buğday İzmir 85 Çeşidinde ve Thatcher Yakın İzogenik Hatlarında Kahverengi Pas Dayanıklılık Geni *Lr13*'ün SSR Markörleriyle İncelenmesi¹

Fatma AYKUT TONK²

Süer YÜCE³

Öz: Bu çalışmada, kahverengi pas dayanıklılık geni *Lr13*'e ait SSR (Simple Sequence Repeat) markörleri, 41 farklı dayanıklılık geni taşıyan Thatcher yakın izogenik hatında incelenmiştir. Duyarlı yerli çeşit İzmir 85, *Lr13* genini taşıyan yakın izogenik hat (12 No'lu hat) ve bunlar arasında yapılan melezlemenin F₁ generasyonunda aynı markörler kullanılmıştır. İncelenen dört SSR marköründen bir tanesi (GWM630) *Lr13* genini taşıyan hatta özgün bir bant deseni vermiştir. Bu bant deseni duyarlı ebeveyn ve F₁ generasyonunda da aynı gözlenmiştir. Bu sonuç, duyarlı ebeveyn İzmir 85 çeşidinin *Lr13* genini taşıyabileceğine işaret etmektedir. Thatcher yakın izogenik hatlarından bireysel DNA ve DNA bulkları oluşturulmuş ve böyle bir uygulamanın Thatcher yakın izogenik hatlarının dahil olduğu moleküler çalışmaların süresi ve maliyeti açısından faydalı olabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Ekmeklik buğday, Thatcher yakın izogenik hatları, SSR, *Lr13*.

Investigation of Brown Rust Resistance Gene *Lr13* in Bread Wheat Variety İzmir 85 and Thatcher Near Isogenic Lines with SSR Markers

Abstract: In this research, SSR (Simple Sequence Repeat) markers for brown rust resistance gene *Lr13* were screened in Thatcher near isogenic lines containing 41 different resistance genes. Same markers were tested in susceptible local variety İzmir 85, near isogenic line (the line of 12 number) containing *Lr13* and F₁ generation of the cross between this variety and the line. One of the four SSR markers examined (GWM630) generated a specific band pattern in the line carrying *Lr13*. This band pattern was observed in the susceptible parent and F₁ generation, too. This result is suggested that susceptible parent İzmir 85 variety may have *Lr13*. Individual DNA and DNA bulks were constructed from Thatcher near isogenic lines and it was

¹ Bu çalışma E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalında yürütülen doktora tez projesinin bir bölümüdür.

² Dr., E.Ü.Z.F. Tarla Bitkileri Bölümü, 35100 Bornova-İzmir, fatma.aykut@ege.edu.tr

³ Prof.Dr., E.Ü.Z.F. Tarla Bitkileri Bölümü, 35100 Bornova-İzmir

concluded that such an application can be useful in terms of time and cost of the molecular researches including Thatcher near isogenic lines.

Key words: Bread wheat, Thatcher near isogenic lines, SSR, *Lr13*.

Giriş

Puccinia recondita Roberge ex Desmaz. f. sp. *tritici* Eriks. & E. Henn'in neden olduğu buğday kahverengi pası, hemen hemen buğdayın yetiştiği her yerde görülmektedir. Buğdayda görülen diğer iki pas hastalığıyla karşılaştırıldığında daha düzenli olarak her yıl ortaya çıkmaktadır (Chester, 1946; Samborski, 1985). Buğday kahverengi pas fungusu farklı iklimlere adapte olmuş ve dünyada buğday yetişen farklı alanlarda görülebilmektedir (Roelfs ve ark. 1992). A.B.D., Kanada, Batı Avrupa, Doğu Rusya, Sibiryaya, Çin, Güney Amerika, Kuzey Afrika, Hindistan, Japonya, Avustralya ve İskandinavya en yaygın olduğu ülkeler ve bölgelerdir. Türkiye'de ise başta Trakya olmak üzere Ege, Marmara, Karadeniz gibi bütün sahil bölgeleri ile geçit bölgeleri ve Orta Anadolu'da özellikle sulanır alanlarda etkili olmaktadır (Altay, 1980).

Kahverengi pas genellikle yapraklarda oluşturduğu püstüller ile fotosentez alanını kısıtlamaktadır. Ürün kaybı, baştaki tane sayısının azalması, tane boyutunun küçülmesi, 1000 tane ve hektolitre ağırlığının azalması şeklinde olmakta, protein içeriğinin azalması ile de kalite kaybı oluşmaktadır (Arslan ve ark. 2002; Lipps, 2006). Kahverengi pasın oluşturduğu kayıplar genellikle çok fazla değildir (< % 10) fakat çok büyük kayıplar da (% 30'dan daha fazla) gözlenebilir (Roelfs ve ark. 1992).

Günümüzde kahverengi pasa dayanıklılık sağlayan 50'nin üstünde farklı gen bilinmektedir (McIntosh ve ark. 2003). Bu dayanıklılık genleri arasında, büyük olasılıkla *Lr13* dünya çapında ekmeklik buğdayda en çok görülen gendir (McIntosh ve ark. 1995; Seyfarth ve ark. 2000a). Örneğin CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo) buğday varyetelerinin büyük bir kısmı *Lr13* genini taşımaktadırlar (Rajaram ve ark. 1988; Seyfarth ve ark. 2000a). Normal şartlar altında bu dayanıklılık geni, ergin dönem dayanıklılığının karakteristiği olan ergin bitki döneminde dayanıklılık sağlamaktadır (McIntosh ve ark. 1995; Seyfarth ve ark. 2000a).

Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR)'na dayalı DNA markörleri arasında yer alan SSR (Simple Sequence Repeat) markörleri, genomdaki basit sekans tekrarlarından yararlanarak, bir lokusun iki allelindeki tekrarların sayısındaki

farklılığa bağlı polimorfizmi belirlemektedir (Jones ve ark. 1997). Kahverengi pas dayanıklılık genlerine ait markörlerinin belirlenmesinde SSR ve diğer DNA markörleri başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Seyfarth ve ark. (2000a) SSR markörlerini iki farklı ekmeklik buğday populasyonunda kullanarak *Lr13* genine ait markörü belirlemişlerdir. Greganova ve ark. (2003) Slovakya kışlık buğday çeşitlerinde *Lr13* genini SSR markörleriyle araştırmışlardır. Blaszczyk ve ark. (2005) *Lr13* genine ait markörü belirlemek için ^{PstI}AFLP tekniğini kullanmışlardır.

Yakın izogenik hatlar (Nearly Isogenic Lines, NIL) markörlerin belirlenmesinde kullanılan ilk materyallerden birisidir. İki yakın izogenik hat arasında DNA seviyesinde belirlenen herhangi bir polimorfizmin, ilgilenilen hedef gen ile sıkı bir linkage durumunda olma olasılığı çok yüksektir. Çünkü yakın izogenik hatlar sadece, ilgilenilen gendeki ve komşu kromozomal bölgedeki allel grupları bakımından farklıdırlar (Masojc, 2002). *Lr* dayanıklılık genlerini taşıyan yakın izogenik hatlar yazlık buğday çeşidi Thatcher kullanılarak oluşturulmuştur. Thatcher yakın izogenik hatları dayanıklılık genlerini saptamada olduğu kadar patojen virulent kombinasyonlarının belirlenmesinde de çok yararlıdırlar (Winzeler ve ark. 2000).

Bu çalışmanın amacı, *Lr13* genine ait SSR markörlerinin, Thatcher yakın izogenik hatlarında, duyarlı ebeveyn olarak yerli bir çeşitte, *Lr13* genini taşıyan dayanıklı ebeveyn olarak yakın izogenik bir hatta ve bunların melezinin F₁ generasyonunda incelenmesidir.

Materyal ve Yöntem

CIMMYT'ten temin edilmiş her biri farklı bir kahverengi pas dayanıklılık geni taşıyan yakın izogenik hatlar, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiş kahverengi pasa duyarlı İzmir 85 çeşidi ve *Lr13* genini taşıyan 12 No'lu dayanıklı hat (Tc*6/Frontana) ve bunlar arasında yapılan melezlemenin (İzmir 85 x 12 No'lu dayanıklı hat) F₁ generasyonu çalışmanın materyalini oluşturmuştur. Thatcher yakın izogenik hatlarının pedigrileri ve taşıdıkları kahverengi pas dayanıklılık genleri Çizelge 1'de verilmiştir.

Çalışmanın DNA analizleri Almanya Justus Liebig Üniversitesi, Agronomi ve Bitki Islahı Enstitüsü I, Bitki Islahı Bölümü laboratuvarlarında yürütülmüştür.

10-15 cm boyunda olan bitkilerden yaklaşık 100 mg taze yaprak örnekleri alınmış ve sıvı nitrojen içerisinde dondurulmuştur.

Doyle and Doyle (1987) metoduna göre CTAB mini izolasyon yöntemi kullanılarak genomik DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA ekstraktları kullanıma kadar -20'de saklanmıştır.

Çalışmanın başlangıç aşamasında *Lr11* ve *Lr13* genlerine ait markörlerin araştırılması hedeflenmiştir. Bu nedenle Thatcher yakın izogenik hatları DNA'larından Çizelge 2'de verildiği gibi bulklar oluşturulmuştur. *Lr11* ve *Lr13*'ü taşıyan hatlar ayrı değerlendirilmiş, ancak bu genlerin lokalize olduğu kromozomlarda yer alan diğer dayanıklılık genlerini taşıyan hatların DNA'ları eşit oranda bir araya getirilmiştir. Söz konusu kromozomlar dışında lokalize olmuş genleri taşıyan diğer hatlardan ise herhangi bir ortak özellik gözetmeden bulklar oluşturulmuştur.

Çizelge 1. CIMMYT'den temin edilen Thatcher yakın izogenik hatları.

Hatlar	Pedigrileri	<i>Lr</i> genleri
1	Tc*6 / Centenario	<i>Lr1</i>
2	Tc*6 / Webster	<i>Lr2a</i>
3	Tc*6 / Carina	<i>Lr2b</i>
4	Tc*6 / Loros	<i>Lr2c</i>
5	Tc*6 / Democrat	<i>Lr3</i>
6	Bage / Tc*8	<i>Lr3bg</i>
7	Tc*6 / Aniversario	<i>Lr3ka</i>
8	Transfer / Tc*6	<i>Lr9</i>
9	Tc*6 / Exchange	<i>Lr10</i>
10	Tc*2 / Hussar	<i>Lr11</i>
11	Exchange / Tc*6 APRes.	<i>Lr12</i>
12	Tc*6 / Frontana	<i>Lr13</i>
13	Selkirk / Tc*6	<i>Lr14a</i>
14	Tc*6 / Mario Escobar	<i>Lr14b</i>
15	Tc*6 / Kental 483 (RL6052)	<i>Lr15</i>
16	Tc*6 / Exchange	<i>Lr16</i>
17	Klein Lucero / Tc*6	<i>Lr17</i>
18	Tc*7 / Africa 43	<i>Lr18</i>
19	Tc*7 / Transl. 4-A. elongatum	<i>Lr19</i>
20	Tc*6 / Jimmer	<i>Lr20</i>
21	Tc*6 / RL 5406 T.C.xAe. squ...	<i>Lr21</i>

Çizelge 1'in devamı.

22	Tc*6 / RL 5404 T.C.xAe. squ...	Lr22
23	Lee 310 / Tc*6	Lr23
24	Tc*6 / Agent	Lr24
25	Tc*6 / Transec.	Lr25
26	Tc*6 / St-1-25	Lr26
27	Tc*6 / C-77-1	Lr28
28	Tc*6 / CS7D-Ag#11	Lr29
29	Tc*6 / Terenzio	Lr30
30	Tc*6 / 3 / Ae. squarrosa	Lr32
31	Tc*6 / PI 58548 (1+gene)	Lr33
32	Tc*6 / PI 58548 (2+gene)	Lr34
33	Tc*6 / RL5711	Lr35
34	Tc*6 / VPM	Lr37
35	Tc*6 / T7 Kohn	Lr38
36	Tc*6 / TMR-514-12-24	Lr38
37	Tc*6 / T. spelt.	Lr44
38	Tc*6 / 8404	Lr44
39	Tc*6 / Carina	LrB
40	Tc*6 / PI 268316	LrB
41	Tc*6 / V336	LrW

PCR işleminde Somers ve ark. (2004)'nın yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Toplam 15 µl reaksiyon hacminde; 50 ng DNA, 1 X PCR buffer (Eppendorf Brinkmann Ins. USA), 0.2 mM dNTP (PeQlab Biotech. GmbH), 0.7 mM Mg(OAc)₂ (Eppendorf Brinkmann Ins. USA), 0.75 ng F-Primer, 0.75 ng R-primer, 0.75 ng M13 (IRD700 veya IRD800 ile işaretlenmiş, MWG Biotech.) ve 0.5 ünite Taq Polimeraz enzimi (Eppendorf Brinkmann Ins. USA) yer almıştır. Floresan boya IRD700 veya IRD800 ile işaretlenmemiş F-Primerler kullanıldığı için standart bir sekanslama primeri olan M13, F-Primerin 5-ucuna eklenecek şekilde PCR bileşenleri arasında yer almıştır (Oetting ve ark. 1995).

Lr13 geni için SSR primerleri Seyfarth ve ark. (2000a)'un çalışmasından yararlanılarak kullanılmıştır (Çizelge 3). *Lr11* geni ile ilgili olarak doyurucu sonuçlar elde edilemediğinden değerlendirmelere devam edilmemiştir.

Çizelge 2. Thatcher yakın izogenik hatlarından oluşturulan bireysel DNA ve bulklar.

Bireysel DNA ve Bulklar	Oluşturan hat ve dayanıklılık genleri	Kromozom lokasyonları
1-DNA	10 No'lu hat- <i>Lr11</i>	2A
2-DNA Bulki	17 No'lu hat - <i>Lr17</i> 34 No'lu hat - <i>Lr37</i>	2AS 2AS
3-DNA	12 No'lu hat - <i>Lr13</i>	2BS
4-DNA Bulki	16 No'lu hat - <i>Lr16</i> 23 No'lu hat - <i>Lr23</i> 33 No'lu hat - <i>Lr35</i>	2BS 2BS 2B
5-DNA Bulki	1 No'lu hat - <i>Lr1</i> 2 No'lu hat - <i>Lr2a</i> 3 No'lu hat - <i>Lr2b</i> 4 No'lu hat - <i>Lr2c</i> 5 No'lu hat - <i>Lr3</i> 6 No'lu hat - <i>Lr3bg</i> 7 No'lu hat - <i>Lr3ka</i> 8 No'lu hat - <i>Lr9</i> 9 No'lu hat - <i>Lr10</i>	5DL 2DS 2DS 2DS 6BL 6BL 6BL 6BL 1AS
6-DNA Bulki	11 No'lu hat - <i>Lr12</i> 13 No'lu hat - <i>Lr14a</i> 14 No'lu hat - <i>Lr14b</i> 15 No'lu hat - <i>Lr15</i> 18 No'lu hat - <i>Lr18</i> 19 No'lu hat - <i>Lr19</i> 20 No'lu hat - <i>Lr20</i> 21 No'lu hat - <i>Lr21</i> 22 No'lu hat - <i>Lr22</i>	4BS 7BL 7BL 2DS 5BL 7DL 7AL 1DS 2DS
7-DNA Bulki	24 No'lu hat - <i>Lr24</i> 25 No'lu hat - <i>Lr25</i> 26 No'lu hat - <i>Lr26</i> 27 No'lu hat - <i>Lr28</i> 28 No'lu hat - <i>Lr29</i> 29 No'lu hat - <i>Lr30</i> 30 No'lu hat - <i>Lr32</i> 31 No'lu hat - <i>Lr33</i> 32 No'lu hat - <i>Lr34</i>	3D 4BS 1BL 4AL 7DS 4AL 3DS 1BL 7DS
8-DNA Bulki	35 No'lu hat - <i>Lr38</i> 36 No'lu hat - <i>Lr38</i> 37 No'lu hat - <i>Lr44</i> 38 No'lu hat - <i>Lr44</i> 39 No'lu hat - <i>LrB</i> 40 No'lu hat - <i>LrB</i> 41 No'lu hat - <i>LrW</i>	6DL - 1B - - - -

PCR amplifikasyonu thermocycler (GeneAmp PCR System 9700, Perkin Elmer) cihazında, başlangıç denatürasyonundan (95°C'de 3 dak.) sonra 94°C'de 40 saniye, 60°C'de 30 saniye, 72°C'de 45 saniye olacak şekilde 35 döngüden ve son sentez devresinden (72°C'de 10 dak.) oluşmuştur.

PCR amplifikasyonundan sonra örneklere eşit hacimde formamide yükleme tamponu [% 96 formamide (v/v), 10 mM EDTA pH 8.0, % 0.1 fuchsin] eklenmiş ve 94 °C'de 1.5 dakika denatürasyonları sağlanmıştır. 25 cm % 8'lik poliakrilamid jele (Long Ranger, FMC Biozym) 0.5-1.5 µl miktarları arasında örnekler yüklenmiş ve standart DNA olarak IRDye 50-350 bç (MWG Biotech.) kullanılmıştır. Elektrot tampon çözeltisi olarak 10 X TBE tamponundan seyreltilen 1 X TBE kullanılmıştır. 1500 V, 40 W, 35 mA ve 48°C değerlerinde LI-COR DNA GeneReader 4200 (MWG Biotech. Ebersberg/Germany) cihazında elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bant şablonları Saga^{MX} yazılım programı kullanılarak doğrudan bilgisayara aktarılmıştır.

Çizelge 3. SSR primer kombinasyonları ve baz dizilişleri.

SSR	İleri Primer	Geri Primer	Lokasyon
GWM 120	GATCCACCTTCCTCTCTC	GATTATACTGGTGCCGAAAC	2B
GWM 319	GGTTGCTGTACAAGTGTTCACG	CGGGTGCTGTGTGTAATGAC	2B
GWM 388	CTACAATTCGAAGGAGAGGGG	CACCGCTCAACTACTTAAGC	2B
GWM 630	GTGCCTGTGCCATCGTC	CGAAAGTAACAGCGCAGTGA	2B

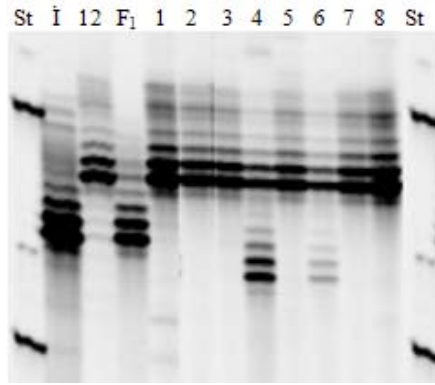
Araştırma Bulguları

Çalışmada *Lr13* geni için kullanılan primerler öncelikle İzmir 85, 12 No'lu hat, bunların F₁ generasyonu ile bireysel DNA ve DNA bulklarında incelenmiştir. Aynı primerler Thatcher yakın izogenik hatlarında da tekrar araştırılmıştır.

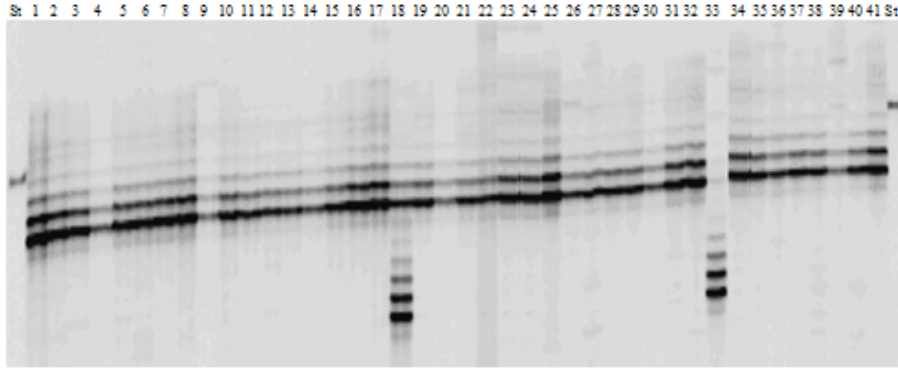
İncelenen 4 SSR primerinden GWM120 primerinin vermiş olduğu bantlar 145-175 bç (baz çifti) arasında saptanmıştır. Duyarlı çeşit İzmir 85 ile F₁ aynı bant desenini sergilerken, *Lr13* genini taşıyan 12 No'lu hattın farklı bir banda sahip olduğu görülmüştür. Ancak 12 No'lu hattın bant deseni dayanıklı hatlardan oluşturulan bireysel DNA

ve DNA bulkları ile aynı gözlenmiştir. Sadece 4. sıradaki bulk farklı bir bant vermiştir (Şekil 1).

GWM120 primerinin Thatcher yakın izogenik hatlarında incelenmesi sonucu 18 ve 33 No'lu hatların dışındaki tüm hatların aynı bant desenine sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 2). 18 ve 33 No'lu hatların bantlarının moleküler ağırlıkları diğer hatların bantlarından daha büyük gözlenmiştir. 12 No'lu hatta bakıldığında diğer dayanıklı hatlardan farklı bir bant deseni sergilememiştir.



Şekil 1. GWM120 primerinin ebeveynler, F₁ ve bireysel DNA ve DNA bulklarında sonuçları. St: Standart DNA, İ: İzmir 85, 12: 12 No'lu hat, F₁: İzmir 85 x 12 No'lu dayanıklı hat, 1-8: bireysel DNA ve DNA bulkları (Çizelge 2'ye göre).



Şekil 2. GWM120 primerinin yakın izogenik hatlarda sonuçları. St: Standart DNA, 1-41: Thatcher yakın izogenik hatları (Çizelge 1'e göre).

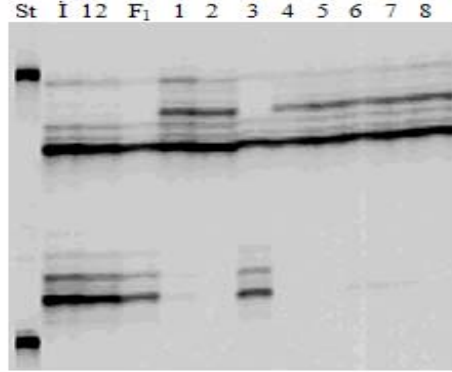
GWM319 primeri 175-230 bç değerleri arasında iki bant vermiştir. Sadece 4. sıradaki bulk hariç ebeveynler, F₁ ve bireysel DNA ve DNA bulklarında monomorfik bant şablonunu göstermiştir. 4.

sıradaki bulkün ilk bandının moleküler ağırlığı daha küçük gözlenmiştir. GWM319 primeri ebeveynler, F_1 ve bulklerde olduğu gibi yakın izogenik hatlarda da iki farklı bant vermiştir. İncelenen hatlardan 18, 26 ve 33 No'lu hatlar hariç diğer hatların bant deseni monomorfik olarak gözlenmiştir. 12 No'lu hatta monomorfik bant gösteren hatlar arasında yer almıştır.

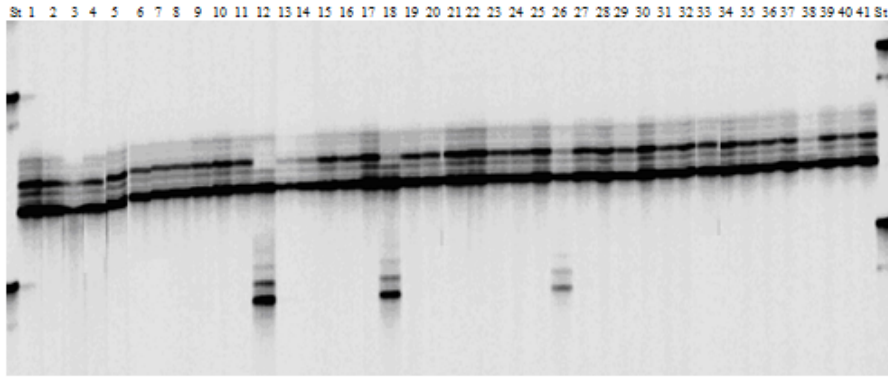
İncelenen diğer bir primer GWM388'in iki adet bant verdiği, İzmir 85 ile 12 No'lu hattın bant desenlerinin farklı olduğu, F_1 'in bant deseninin duyarlı ebeveyn İzmir 85 ile aynı olduğu gözlemlenmiştir. Ancak 12 No'lu hat ile bireysel DNA ve DNA bulklerinin monomorfik bant desenine sahip olduğu belirlenmiştir. GWM388 primeri dayanıklı yakın izogenik hatlarda da iki adet bant vermiş ve bu bantlar 145-200 bç standart DNA segmentleri arasında gözlenmiştir. Elde edilen bantların tüm yakın izogenik hatlarda monomorfik olduğu tespit edilmiştir.

GWM630 SSR primerinin vermiş olduğu bantlar 120-145 bç standartları arasında saptanmıştır. Duyarlı ebeveyn İzmir 85, 12 No'lu hat ve bunların F_1 'inde bant desenlerinin aynı olduğu, diğer bireysel DNA ve DNA bulklerinde ise farklı olduğu gözlenmiştir (Şekil 3). GWM630 primeri ebeveynler ile F_1 'de iki adet bant vermiş, bireysel DNA ve DNA bulklerinde ise tek bant vermiştir. GWM630 primerinin Thatcher yakın izogenik hatlarında incelenmesi sonucu; 12 No'lu hatla birlikte 18 ve 26 No'lu hatların bant desenlerinin diğer hatlardan farklı olduğu ve bu hatların ikişer adet banda sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4). Ayrıca 12, 18 ve 26 numaralı hatların diğer hatlarla ortak olan birinci bantlarına bakıldığında; 18 ve 26 No'lu hatların birinci bantları diğer hatlarla aynı görülmektedir. 12 No'lu hattın diğer tüm hatlardan tek farkı ise diğer hatlarla ortak olan birinci banttaki bir DNA segmentinin olmamasıdır.

İncelenen primerlerin hepsinde, bireysel DNA ve DNA bulklerinden elde edilen bant desenleri bu bulklerin oluşturulduğu yakın izogenik hatlarda da aynı sonucu göstermiştir. Örneğin; GWM120 primeri 4. ve 6. bulkta diğer bireysel DNA ve DNA bulklerinden çok belirgin olarak farklı bir bant vermiş (Şekil 1) ve aynı primer yakın izogenik hatlarda incelendiğinde sırasıyla 4. ve 6. bulkta yer alan 33 ve 18 No'lu hatlarda da aynı bant çok net bir şekilde elde edilmiştir (Şekil 2).



Şekil 3. GWM630 primerinin ebeveynler, F₁ ve bireysel DNA ve DNA bulklarında sonuçları. St: Standart DNA, İ: İzmir 85, 12: 12 No'lu hat, F₁: İzmir 85 x 12 No'lu dayanıklı hat, 1-8: bireysel DNA ve DNA bulkları (Çizelge 2'ye göre).



Şekil 4. GWM630 primerinin yakın izogenik hatlarda sonuçları. St: Standart DNA, 1-41: Thatcher yakın izogenik hatları (Çizelge 1'e göre).

Tartışma ve Sonuç

İncelenen mikrosatelit primerlerinden GWM120 ve GWM388'in vermiş olduğu bantlar ebeveynlerde polimorfik sonuçlar vermiş, F₁'in bant deseni İzmir 85 çeşidiyle aynı elde edilmiştir. Ancak bu primerler kullanılarak bireysel DNA ve DNA bulkları ile birlikte yakın izogenik hatlarda 12 No'lu hattı ayırt edici bir bant şablonu elde edilememiştir.

GWM319 ve GWM630 primerleri ebeveynler ve F₁'de monomorfik bant şablonu sergilemiştir. Aynı primerler Thatcher yakın izogenik hatlarında incelendiğinde; GWM319'un hatlarda monomorfik bant verdiği, GWM630 primerinin 12 No'lu hatla birlikte 18 ve 26 No'lu hatlarda farklı bant deseni sergilediği saptanmıştır. Ancak 18 ve

26 No'lu hatlarda elde edilen bant segmentlerinden bir tanesi 12 No'lu hatta gözlenmemiş ve ayırıcı bir özellik oluşturmuştur.

İncelenen mikrosatelit primerlerinden GWM120, GWM388 ve GWM319'un *Lr13* genini taşıyan 12 No'lu hattı diğer yakın izogenik hatlardan ayırt edici bir bant deseni sergilemediği ve bu nedenle de incelenen materyalde *Lr13* geni ile bir ilişkilerinin olmadığı düşünülmektedir. Nitekim Seyfarth ve ark. (2000a) Th*Lr13* x Frisal melezinin F₂ populasyonunda *Lr13* geni ile GWM120, GWM319, GWM388 ve GWM630 primerlerinin linkage durumunda olduğunu belirlemişler ancak Th*Lr13* x Thatcher melezinin F₂ populasyonunu kullandıklarında aynı primerlerin farklı sonuçlar verdiğini ve sadece GWM630 primerinin *Lr13* geni ile linkage durumunda olduğunu saptamışlardır. GWM630 ile *Lr13* geninin arasında uzaklığı 10.7 cM olarak belirlemişlerdir. İkinci populasyonda elde ettikleri bu farklılığın melezlenen ebeveynlerin yakın akraba olmalarından kaynaklandığını, çünkü bunların yakın izogenik hatlar olduğunu ve genomlarının % 99'nun ortak olduğunu vurgulamışlardır.

Yapılan SSR analizleri sonucu farklı kahverengi pas dayanıklılık genleri taşıyan Thatcher yakın izogenik hatları arasında 12 No'lu hattın farklılık gösterdiği tek primer GWM630 primeridir. GWM630 primeri ekmeklik buğdayın 2B kromozomunun kısa kolunda lokalize olmuştur (Röder ve ark. 1998). Kullanılan ebeveynler arasında bu primer monomorfik bant deseni vermiştir. Duyarlı ebeveyn olarak kullanılan İzmir 85 çeşidinin *Lr13*'ü taşıma olasılığı yüksektir. Çünkü İzmir 85 çeşidi *Lr13*'ü taşıyan diğer ebeveyn 12 No'lu hatla aynı bant şablonuna sahip olmuştur. McIntosh ve ark. (1995) ve Seyfarth (2000b) kahverengi pas dayanıklılık genleri arasında *Lr13*'ün ekmeklik buğdayda en sık görülen gen olduğunu bildirmişlerdir.

Xgwm630 markörünü kullanarak 8 çeşitte *Lr13* genini kontrol eden Greganova ve ark. (2003) elde ettikleri sonuçları fide döneminde yaptıkları inokülasyon sonuçları ile karşılaştırmışlar ve *Lr13* markörünü saptadıkları bir çeşitte hastalığın da ortaya çıktığını belirtmişlerdir. Bu farklılığı 2 nedene bağlamışlardır; ergin dönem dayanıklılığı sağlayan bir geni fide döneminde yapılan inokülasyonla belirlemenin zor olduğunu, *Lr13* geni ile kullanılan markör arasında 10.7 cM uzaklık bulunduğunu ve bu mesafenin ileriki çalışmalarda markörler yardımıyla seleksiyonda optimal olmadığını vurgulamışlardır. Mohan ve ark. (1997)'a göre bir markörün markörler yardımıyla seleksiyonda başarılı bir şekilde kullanılabilmesi için; ya gen ile o genin markörü birlikte açılma göstermeli ya da aralarındaki

uzaklık 1 cM'dan az olmalıdır. Greganova ve ark. (2003) *Xgwm630* markörünü gen bankasındaki buğday genetik kaynaklarının incelenmesi için kullanılabileceğini belirtmiştir.

Her biri farklı kahverengi pas dayanıklılık geni taşıyan Thatcher yakın izogenik hatlarında yapılan DNA analizleri, bu hatlarında monomorfizm seviyesinin çok yüksek olduğunu göstermiştir. Bu nedenle bu hatlar içerisinde, *Lr13* genini taşıyan 12 No'lu hatta özgün bantların elde edilmesi, bu bantların *Lr13* markörü olma olasılığını arttırmaktadır. Seyfarth (2000b), yakın izogenik hatların düşük seviyede polimorfizm göstermelerine rağmen arzu edilen özelliklere bağlı moleküler markörlerin saptanmasında kullanılan en iyi materyalden birisi olduğunu vurgulamıştır.

Ayrıca bu çalışma ile yakın izogenik hatlardan oluşturulan bireysel DNA ve DNA bulklarının vermiş olduğu bant şablonlarının yakın izogenik hatlardan elde edilen sonuçlarla aynı olduğu belirlenmiştir. Böyle bir uygulama, yakın izogenik hatların dahil olduğu moleküler çalışmalarda kısa sürede çok sayıda markörün araştırılmasına olanak verebilir. Dolayısıyla, bu tür çalışmaların süresini kısaltacağı ve maliyetini düşüreceği nedenleri ile pratikte önemi büyüktür.

Teşekkür

Araştırmada kullanılan genetik materyalin sağlanmasında yardımlarından dolayı CIMMYT'e, Almanya Justus Liebig Üniversitesi, Agronomi ve Bitki Islahı Enstitüsü I, Bitki Islahı Bölümü Laboratuvarlarını kullanmamızı sağlayan Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Friedt'e ve yardımlarından dolayı Dr. Carola Wagner'a çok teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Altay, F. 1980. Kahverengi Pasa Mukavemet Kaynakları ve Islahı, s.217-240. Bitki Islahı Simpozyumu (22-25 Mayıs 1979, Menemen-İzmir), Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Yayınları, NO:17/41.
- Arslan, Ü., K. Yağdı ve E. Aydoğan. 2002. Bursa ili ekolojik koşullarında buğday kahverengi pası (*Puccinia recondita* Roberge ex Desmaz. f.sp. *tritici*)'na karşı bazı ekmeklik buğdayların reaksiyonları ve verim kayıplarının belirlenmesi. Ulud. Üniv. Zir. Fak. Derg. 16:201-210.
- Blaszczyk, L., M. Tyrka and J. Chelkowski. 2005. ^{Pst1}AFLP based markers for leaf rust resistance genes in common wheat. J. Appl. Genet. 46(4):357-364.
- Chester, K. S. 1946. The Nature and Prevention of the Cereal Rusts as Exemplified in the Leaf Rust of Wheat. Waltham, MA: Chronica Botanica. 169 pp.
- Doyle, J. F. and A. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19:11-15.

- Greganova, Z., J. Kraic and Z. Galova. 2003 Diagnostic of wheat leaf rust resistance genes by DNA markers and their application in MAS. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 39(4): 127–129.
- Jones, N., H. Ougham and H. Thomas. 1997. Markers and mapping: we are all geneticists now. *New Phytol.* 137: 165–177.
- Lipps, P. E. 2006. Ohio State University, Extension FactSheet, Plant Pathology, <http://ohioline.osu.edu/ac-fact/0006.html>.
- Masojc, P. 2002. The application of molecular markers in the process of selection. *Cellular & Molecular Biology Letters* 7:499 – 509.
- McIntosh, R.A., C.R. Wellings and R.F. Park. 1995. *Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes*. CSIRQ Australia/Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- McIntosh, R. A., R. Appels, K.M. Devos, J. Dubcovsky, W.J. Rogers and Y. Yamazaki. 2003. Catalogue of gene symbols for wheat, *Proc. 10TH Intern. Wheat Genet. Symp. Paestum Italy*.
- Mohan, M., S. Nair, A. Bhagwat, T.G. Krishna, M. Yano, C.R. Bhatia and T. Sasaki. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding* 3:87-103.
- Oetting, W. S., H.K. Lee, D.J. Flanders, G.L. Wiesner, T.A. Soller and R.A. King. 1995. Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. *Genomics* 30:450-458.
- Rajaram, S., R.P. Singh and E. Torres. 1988. Current CIMMYT approaches in breeding wheat for rust resistance. In: Simmonds NW and Rajaram S (eds) *Breeding Strategies for Resistance to the Rusts of Wheat*. CIMMYT, Mexico, D.F. pp 101-117.
- Roelfs, A. P., R.P. Singh and E.E. Sari. 1992. Rust diseases of wheat: Concepts and methods of diseases management, Mexico, D. F.: CIMMYT, 81 pages.
- Röder, M. S., V. Korzun, K. Wendehake, J. Plaschke, M.H. Tixier, P. Leroy and M.W. Ganal. 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149:2007-2023.
- Samborski, D. J. 1985. Wheat leaf rust, In: Roelfs A. P., Bushnell W. R. (eds) *The Cereal Rusts vol II: Diseases, Distribution, Epidemiology, and Control*, Academic Press, Orlando, pp:39-59.
- Seyfarth, R., C. Feuillet, G. Schachermayr, M. Messmer, M. Winzeler and B. Keller. 2000a. Molecular mapping of the adult-plant leaf rust resistance gene *Lr13* in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Genet. & Breed.* 54:193-198.
- Seyfarth, R.. 2000b. Development of Molecular Markers for the Adult Plant Leaf Rust Resistance Genes *Lr13* and *Lr35* in Wheat. PhD Thesis, Swiss Federal Institute of Technology, Zürich, 75p.
- Somers, D. J., P. Isaac and K. Edwards. 2004. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 109:1105–1114.
- Winzeler, M., A. Mesterházy, R. F. Park, Bartos, M. Csösz, H. Goyeau, M. Ittu, E. Jones, F. Löschinger, K. Manninger, M. Pasquini, K. Richter, D. Rubiales, G. Schachermayr, A. Strzembicka, M. Trotter, O. Unger, G. Vida and U. Walther. 2000. Resistance of European winter wheat germplasm to leaf rust. *Agronomie* 20:783–792.