

Azərbaycanda Buğda Genotiplərində Gövdə Pasının TKTTF Ras Qrupuna Effektiv Davamlı *Sr11*, *Sr26* və *Sr31* Genlərinin İdentifikasiyası

S.M. Rüstəmov, A.T. Hacıyeva, Ş.F. Sadıqov, Ə.Ç. Məmmədov, İ.M. Hüseynova*

AMEA Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutu, Mətbuat prospekti, 2A, Bakı AZ1073, Azərbaycan; *E-mail: i_guseynova@mail.ru

İlk dəfə olaraq KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) genotipləşdirmə texnologiyası tətbiq olunmaqla buğdanın rüşeym plazması yoxlanılmış və gövdə pasının Azərbaycanda yayılan TKTTF ras qrupuna effektiv davamlı gen mənbələri xarakterizə edilmişdir. Diallel tipli KASP_6BL_BS0074288_51 praymeri ilə aparılan Real zamanda gedən PZR (RT-PZR) analizləri nəticəsində 34 buğda genotipindən 9-nun, KASp_6BL_Tdurum contig55744_822 praymeri ilə 10 genotipdən 7-nin 6B xromosomunda *Sr11* geni identifikasiya edilmişdir. Dominant STS marker *Sr26#43* ilə aparılan PZR nəticəsində 42 buğda genotipindən 11-də *Sr26* geni üçün diaqnostik amplikon hesab olunan 207 bp uzunluğunda fraqment sintez olunmuşdur. 42 buğda genotipinin 1BL.1RS translokasiyasında yerləşən Lr26-Sr31-Yr9 lokusun spesifik İag95 praymeri ilə analizi zamanı 8 genotipdə *Sr31* geni üçün xarakterik 1100 bp uzunluğunda DNT fraqmentin sintezi müəyyən edilmişdir.

Açar sözlər: Buğda, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, *Sr11*, *Sr26*, *Sr31*, KASP-genotipləşdirmə, RT-PZR

GİRİŞ

Dənli bitkilərin pas xəstəlikləri dünyanın bir çox ölkələrində olduğu kimi, Azərbaycanda da kifayət dərəcədə təhlükəli xəstəlik hesab olunur. Bunlardan biri də *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* tərəfindən törədilən gövdə pası xəstəliyidir. Gövdə pası əkinlərə dağıdıcı təsir göstərən ən təhlükəli xəstəlik hesab olunur (Singh et al., 2008; Yu et al., 2017). İlk dəfə gövdə pası xəstəliyi Azərbaycanda 1927-ci ildə müşahidə edilmiş və 1975-ci ilə qədər geniş yayılmışdır. 1979-cu ildən uzun müddət ərzində bu xəstəliyin depressiyaya uğramasına baxmayaraq, 2013-cü ildə yenidən İCARDA-dan introduksiya edilmiş 11thRWKLDN-CWAC-12 yumşaq buğda sortunda vegetasiyanın sonunda 20-30S səviyyəsində gövdə pası müşahidə edilmişdir. 2014-2015-ci illərdə isə artıq Azərbaycanın müxtəlif bölgələrində, o cümlədən Gəncə-Qazax bölgəsinin Samux rayonu ərazisində, Tərtər Bölgə Təcrübə Stansiyasında, İsmayılı rayonunda və Abşeron ərazisində becərilmiş buğda və bəzən də yulaf bitkilərində aşağı (10-20S) və yuxarı (50S) səviyyədə gövdə pasının yayıldığı müəyyən edilmişdir. Hal-hazırda dünyada buğda məhsulunu həтта 90-100% məhv edən gövdə pasının yeni "Ug99" rası yayılmağa başlamışdır (Beard et al., 2006, Yu et al., 2014). *Ug99* ras qrupunun fəal olduğu sahələrdə aparılan test işlərində beynəlxalq buğda genetik materialının 80-90%-nin bu rasa qarşı həssas olduğu bildirilir. Gövdə pasının *Ug99* rası Yaxın Şərq ölkələrində geniş yayılmış və Mərkəzi Asiya ölkələrində də miqrasiya edir (Baranova et al., 2015). İran İslam Respublikasının Azərbaycanla

400-500 km məsafəlik ərazisində də bu təhlükəli rasaya rast gəlinmişdir. Buna görə də respublikamızda təsadüf olunan gövdə pası nümunələrinin ras tərkibini molekulyar səviyyədə müəyyənləşdirmək məqsədilə AMEA Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutu ilə ABŞ Kənd Təsərrüfatı Departamenti Bitki xəstəlikləri laboratoriyası ilə birgə tədqiqatlar aparmışdır. 2014-2015-ci illərdə Azərbaycanın müxtəlif regionlarından toplanmış buğda genotiplərini yoluxdurmuş gövdə pası *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (*Pgt*) izolyatlarının molekulyar diaqnostikası və genotipləşdirilməsi məqsədi ilə ikimərhələli skrining aparılmışdır. İlk olaraq *Ug99* ras qrupunu aşkar etmək üçün *qPZR-analiz* həyata keçirilmiş və mənfəi nəticə alınmışdır. İkinci mərhələdə yüksək keçirici SNP (*Single nucleotide polymorphism*) genotipləşdirmə metodu ilə yerli Ptg populyasiyasında 17 Multi-lokus üzrə genotipləşdirmə (MLGs) səviyyəsində genetik müxtəliflik aşkar edilmiş, bunların 18,5%-nin TKTTF ras qrupuna, yerdə qalan nümunələrin elm üçün yeni olan fərqli ras qrupuna aid olduğu müəyyənləşdirilmişdir (Hüseynova et al., 2015).

Gövdə pası obliqat parazit olub təbiətdə böyüməsi və çoxalması üçün sahib bitki toxumasına ehtiyacı var. *Puccinia graminis tritici* patogeninin inkişafı iki sahib bitkidə, zirinc və taxıl bitkilərində gedir. O, 5 fərqli spor mərhələsi ilə tamamlanan heterozis tipli pas göbələyidir, sahib bitkiyə qeyri-cinsi çoxalma mərhələsi müddətində yoluxur (Leonard and Szabo, 2005, Olivera et al., 2015). Gövdə pasına yoluxmuş bitki yarpaqlarında fotosintezin intensivliyinin sağlam yarpaqlara nisbətən 30% azaldığı bildirilir. Gövdə pasına yoluxmuş taxılların gövdə

və yarpaqlarında çoxlu sayda uredium yataqları formalaşır. Qırmızı-qəhvəyi rəngli urediniosporlar gövdə və yarpağın hər iki səthində ləkələr şəklində meydana gəlir. Göbələk pustulaları gövdənin epidermisini dağıtıldığı üçün ilkin olaraq transpirasiya prosesi zəifləyir və bu bitkinin ümumi metabolizminə mənfi təsir göstərir. Həmçinin, bitkinin vaskulyar sistemi zədələnir. Vaxt keçdikcə bir-birinə yaxın yerləşən ləkələr bir-birilə birləşir və fotosintez sahəsini azaldaraq, məhsullarlığın aşağı düşməsinə səbəb olur. Eyni zamanda göbələyin mitseliləri sahib bitkinin hüceyrəarası məsamələrinə daxil olur və haustorilərlə bitki toxumasının inkişafını təmin edən əsas qida maddələrini sorur və bitkinin zəifləməsinə səbəb olur (Schumann et al., 2011; Singh et al., 2002)

Dünyanın müxtəlif ölkələrində buğda sortlarında pas xəstəliklərinə davamlı genlərinin identifikasiyasına və onların müxtəlif coğrafi regionlarda effektivliyinin tədqiqinə dair çoxlu miqdarda tədqiqat işləri aparılır. Genetik davamlılıq gövdə pasının idarə olunmasında istifadə olunan ən effektiv üsullardan biridir. *Komugi Wheat Genetics Resource Database* verilənlər bazasında 69 gövdə pasına qarşı davamlılıq geni (o cümlədən, 45 identifikasiya olunmuş *Sr* geni və 24-müvəqqəti təyinatlı genlər) qeydiyyatdan keçirilmişdir. Davamlı buğdanın yaradılmasında maksimum effektdə nail olmaq üçün davamlılıq genlərinin düzgün kombinasiyalarından istifadə etmək vacibdir (Nirmala et al., 2016).

Tədqiqat işinin əsas məqsədi gövdə pasının Azərbaycanda yayılan TKTF ras qrupuna effektiv davamlılıq *Sr11*, *Sr26* və *Sr31* genlərinin identifikasiya edilməsidir.

MATERIAL VƏ METODLAR

Tədqiqat obyektini kimi Əkinçilik Elmi-Tədqiqat İnstitutunun buğda genofondunda saxlanılan, xəstəliklərə davamlılığına, məhsullarlığına və digər fizioloji əlamətlərinə görə fərqlənən bərk və yumşaq buğda genotiplərindən istifadə edilmişdir.

DNT-nin ekstraksiyası. Bitki nümunələrindən CTAB metodu ilə (Murry and Thompson, 1980) nüvə DNT-si ayrılmışdır. Təzə yarpaqlar götürülərək maye azot vasitəsilə toz halına salınmış və su hamamında 60°C-yə qədər qızdırılmış CTAB ekstraksiya buferində (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM EDTA, pH 8,0; 1,4 mM NaCl; 40 mM β-merkaptotanol) lizis edilmişdir. Ekstraksiya olunan DNT nümunələri TE (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA) buferində saxlanılmışdır.

DNT-nin təmizlik dərəcəsinin və optik sıxlığının təyini. Spektrofotometrik yolla ayrılmış DNT nümunələrinin təmizlik dərəcəsi yoxlanılmışdır (ULTROSPEC 3300 PRO ("AMERSHAM", ABŞ)). DNT nümunələrinin optik sıxlığı 260 və 280 nm dalğa uzunluğunda təyin edilmiş və $1,8 \leq [D_{260}/D_{280}] \geq 2$ şərti ödəyən DNT nümunələri növbəti təcrübələr üçün götürülmüşdür.

KASP-genotipləşdirmə. KASP (Kompetitive Allele Specific PCR - rəqabətli allel-spesifik PZR) genotipləşmə sistemi homogen, fluorescent genotipləşmə texnologiyasıdır. Tədqiqat zamanı bir nümunə üçün ümumi reaksiyanın həcmi 20 µl (10µl kDNT-si + 10 µl reaksiya qarışığı) təşkil etmişdir. RT-PZR reaksiyası üçün istifadə edilən DNT nümunələrinin qatılığı 50 ng/ µl olmuşdur. Reaksiyanın daha optimal getməsi üçün Kasp Master Miksə final qatılığında 1x 2,5 mM olmaqla MgCl₂ əlavə edilmişdir. Kasp assay miksin tərkibinə iki allel-spesifik və bir ümumi revers praymer daxildir. Universal Kasp Master miks PZR reaksiyası üçün lazım olan bütün komponentlərə malikdir. Kasp Master miksin tərkibinə iki ədəd fluorescent nişanlanmış kasset, Kasp Taq polimeraza fermenti, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP və dTTP), reaksiya üçün lazım olan müxtəlif duzlar və reaksiya buferi daxildir. KASP-genotipləşdirmə texnologiyası ilə *Sr11* genini identifikasiya etmək üçün rəqabətli allel-spesifik PZR-i aparmağa imkan verən iki müxtəlif KASP markerindən istifadə edilmişdir (cədvəl 1).

Praymer miksin hazırlanması üçün uyğun KASp_6BL_BS00074288_51 A1 praymerindən 6

Cədvəl 1. *Sr11* geninin identifikasiyası üçün istifadə olunan KASP praymerlərin nukleotid ardıcılıqları

N	Praymerlər	Nukleotid ardıcılığı (5' → 3')
Miks #1	KASp_6BL_BS00074288_51 A1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATGTAAATGTTGA GATACCTTAGCTGAAAT
	KASp_6BL_BS00074288_51 A2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGTAAATGTTGAGATACCTTA GCTGAAAC
	KASp_6BL_BS00074288_51 C	GGAAAACCGTCATCTCGCGTATGTA
Miks #2	Tdurum_contig55744_822 A1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAACTCAAAGCTAAAGGATA AACTAGATGT
	Tdurum_contig55744_822 A2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTCAAAGCTAAAGGATAAAC TAGATGG
	Tdurum_contig55744_822 C	CAACTGATCTAAGTTCCTTTGTCAATTCAT

µl, KASp_6BL_BS00074288_51 A2 praymerindən 6 µl, KASp_6BL_BS00074288_51 C praymerindən isə 15 µl götürülmüş və 23 µl Master Miks əlavə edilərək 54 mM qatılığa çatdırılmışdır. Analoji yolla T.durum_contig55744_822 praymeri üçün də mikس hazırlanmışdır. Reaksiya yığılıqdan sonra tərkiblər RT-PZR aparatına (Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System, USA) yerləşdirilmişdir.

RT-PZR analizin aparılması üçün reaksiya şəraiti cədvəl 2-də verilmişdir. İlk olaraq, reaksiya 94°C temperaturda DNT zəncirinin denaturasiyası ilə başlanmışdır. RT-PZR zamanı ampikon kiçik olduğundan, əvvəlki mərhələ ilə kombinə edildiyi üçün elongasiyanın getməsi üçün 60°C temperaturdan istifadə edilmişdir. Sonuncu mərhələdə fluoressensiyanın oxunması 30°C temperaturda həyata keçirilmişdir.

Cədvəl 2. Rəqabətli allel-spesifik PZR üçün reaksiya şəraiti

Mərhələ	Reaksiya şəraiti	Tsikl sayı
1	30°C, 1"	10
2	94°C, 15 "	
3	94°C, 20 "	
4	61°C, 60 "	26
	94°C, 20 "	
	57°C, 60 "	
5	30°C, 1"	

Sr26 geninin identifikasiyası üçün PZR və gel-elektroforetik analiz. Sr 26 geninin təyini üçün Sr26#43F/Sr26#43R markerindən istifadə edilmişdir (Cədvəl 3). İlk olaraq, markerin DNT üzərinə oturma temperaturunu dəqiqləşdirmək məqsədilə, Multigene Gradient («Labnet», ABS) amplifikatorunda qradientli PZR aparılmışdır.

DNT-nin amplifikasiyası 10x bufer, 20 nq genom DNT, 0,2 mkM praymer, hər birindən 200 mkM olmaqla: dATP, dCTP, dGTP və dTTP, 2,5 mM MgCl₂ və 0,2 vahid Taq-polimerazadan ibarət 25 mkl-lik inkubasiya buferində həyata keçirilmişdir. PZR aşağıdakı şəraitdə getmişdir: 1 tsikl: 94°C-də 4dəq; 10 tsikl: 94°C-də 1 dəq, 36°C -də 1 dəq və 72°C-də 1 dəq; 35 tsikl: 94°C-də 1 dəq, 36,2°C-də 1 dəq, 72°C-də - 1 dəq; Tamamlayıcı elonqasiya tsikli 72°C-də 15 dəq müddətində həya-

ta keçirilmişdir. Reaksiya məhsulları etidium-bromid əlavə edilmiş 1,2%-li aqaroza gelində elektroforez aparılmaqla ayrılmış və UVITEK Gel Documentation System-in köməkliyi ilə sənədləşdirilmişdir.

Sr31 geninin identifikasiyası üçün PZR və gel-elektroforez analiz. Buğda genotiplərində Sr 31 geninin identifikasiyası məqsədilə iag95F/iag95R markeri tətbiq olunmuşdur. Markerin DNT üzərinə oturma temperaturunu dəqiqləşdirmək məqsədilə qradient PZR qoyulmuşdur. DNT-nin amplifikasiyası 10x bufer, 20 nq genom DNT, 0,2 mkM praymer, hər birindən 200 mkM olmaqla: dATP, dCTP, dGTP və dTTP, 2,5 mM MgCl₂ və 0,2 vahid Taq-polimerazadan ibarət 30 mkl-lik inkubasiya buferində həyata keçirilmişdir. PZR aşağıdakı şəraitdə getmişdir: tsikl 1: 94°C-də 3dəq; tsikl 30: 30 san 94°C-də, 1 dəq 51,5°C -də və 70 san 72°C-də; Tamamlayıcı elonqasiya tsikli 72°C-də 10 dəq müddətində həyata keçirilmişdir. Reaksiya məhsulları etidium-bromid əlavə edilmiş 1%-li aqaroza gelində elektroforez aparılmaqla ayrılmış və UVITEK Gel Documentation System-in köməkliyi ilə sənədləşdirilmişdir.

NƏTİCƏLƏR VƏ ONLARIN MÜZAKİRƏSİ

Puccinia graminis f. sp. tritici tərəfindən törədilən buğdanın gövdə pası xəstəliyi ciddi məhsul itkisinə səbəb olur. Genetik davamlılıqdan istifadə edilərək gövdə pasının idarə edilə bilməsinə baxmayaraq, *Puccinia graminis f. sp. tritici*-nin dinamik populyasiyası tez-tez buğdanın gövdə pasına davamlılıq genlərini üstələyir. Genetik baxımdan yeni davamlılıq genlərinin axtarışı, eyni zamanda ras-spesifik və qeyri-spesifik davamlılığı özündə cəmləşdirən sortların yaradılması bu xəstəliyə qarşı uzunmüddətli və effektiv davamlılığı təmin edir. Buna görə də davamlı sortların yaradılması üçün, daimi davamlılığın yeni donorlarının, başqa sözlə, hələlik seleksiyada istifadə olunmayan genlərlə müdafiə olunan, çarpazlaşdırma zamanı əlaməti asanlıqla verə bilən yüksək davamlı nümunələrin axtarılması tələb olunur.

Cədvəl 3. Buğdada gövdə pasına davamlılıq genlərinin identifikasiyası üçün istifadə olunmuş molekulyar markerlər haqqında məlumat

Praymerlər	Genlər	Nukleotid ardıcılığı (5'→3')	Xromo-somda lokalizasiyası	Gözlənilən fraqment (bp)	Ann. temp. (°C)
iag95F iag95R	Sr31	CTC TGT GGA TAG TTA CTT GAT CGA CCT AGA ACA TGC ATG GCT GTT ACA	1B	1100	51,5
Sr26#43F Sr26#43R	Sr26	AAT CGT CCA CAT TGG CTT CT CGC AAC AAA ATC ATG CAC TA	6A	207(250)	56,3

KASP-genotipləşdirmə texnologiyası ilə *Sr11* geninin molekulyar identifikasiyası. KASP (*Competitive Allele Specific PCR* – rəqabətli allel-spesifik PZR) genotipləşdirmə texnologiyası tətbiq olunmaqla, buğda genotiplərinin rüşeym plazması *Sr11* geninə görə skrining edilmişdir. Xromosom lokalizasiyası haqqında məlumatların mövcudluğuna baxmayaraq, buğda seleksiyası proqramlarında *Sr11* geninin seçilməsi üçün diaqnostik markerlər, demək olar ki, mövcud deyildi. 2016-cı ildə ABŞ Kənd Təsərrüfatı Departamenti Bitki xəstəlikləri laboratoriyasının əməkdaşları tərəfindən buğda genomunda *Sr11* genini identifikasiya etməyə imkan verən KASP markerləri işlənilib hazırlanmışdır. Azərbaycanada ilk dəfə olaraq, bu texnologiyadan istifadə etməklə, tək nukleotid polimorfizminə əsaslanan (SNP) qPZR metodu tətbiq edilməklə, buğda genotiplərinin genomları *Sr11* geninə görə yoxlanılmışdır.

Diallel tipli *KASp_6BL_Tdurum contig55744_822* molekulyar markeri ilə aparılan Real zamanda gedən PZR nəticəsində analiz olunan 34 buğda genotipindən 9-nun (Səba, Mirvari, Xəzri, Pirşahin, Əlincə 84, Qaraqılçiq-2, Fərəhim, Farandole, Tigre) 6B xromosomunda *Sr11* geninin mövcudluğu aşkar olunmuşdur. İstifadə etdiyimiz markerlər rəqabətli allel-spesifik markerlər olduğundan, onlar genin hər iki allelini identifikasiya etməyə imkan verir. Cədvəl 4-də *KASp_6BL_Tdurum contig55744_822* markeri ilə aparılan qPZR-in nəticələri verilmişdir. Cədvəldən göründüyü kimi, bu marker tədqiq etdiyimiz genotiplərdə *Sr11* geninin yalnız bir allelini identifikasiya etmişdir. Bu onu göstərir ki, həmin genotiplər *Sr11* geninə görə heterozigotdur.

Tədqiqat zamanı istifadə olunan ikinci diallel tipli *KASP_6BL_BS0074288_51* markeri ilə aparılan qPZR-in nəticələri Cədvəl 5-də göstərilmişdir. Yoxlanılmış 10 genotipdən 7-də *Sr11* geninə görə müsbət nəticə əldə edilmişdir. Bunlar Mirbəşir-50, Qiymətli-2/17, Saratovskaya-29, Kollektivnaya-77, Farandole, Tigre, Tale-38 genotipləridir. *KASP_6BL_BS0074288_51* markeri də rəqabətli allel-spesifik marker olduğundan *Sr11* geninin hər iki allelini analiz etmək imkanı yaranır. Belə ki, Mirbəşir-50, Qiymətli-2/17, Saratovskaya-29 genotiplərində *Sr11* geninin bir allelini, Kollektivnaya-77, Farandole, Tigre, Tale-38 genotiplərində isə ikinci allelini təyin etmək mümkün olmuşdur. Başqa sözlə, *Sr11* geni bu genotiplərdə heterozigot haldadır. Bu markerlə aparılan qPZR nəticəsində 3 genotipdə (Dağdaş, Nurlu-99, Qırmızı buğda) müsbət nəticə əldə edilmişdir.

Sr11 geni buğda genomunun 6B xromosomunda, sentromerə yaxın olan inhibitor B2 genindən 60 santimorgan (cM) məsafədə yerləşir. *Sr11* geninin qonur yarpaq pasına davamlılıq geni *Lr3* ilə

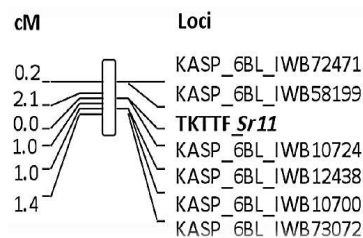
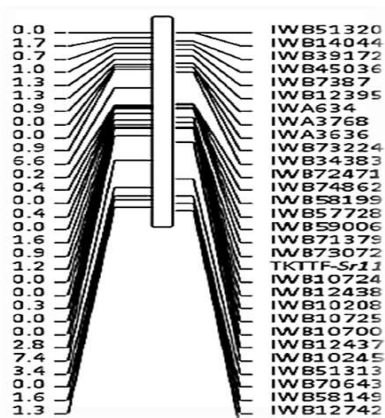
ilişkili olduğu göstərilmişdir (Sears, 1966). Bajgain və həmmüəllifləri tərəfindən göstərilmişdir ki, gövdə pasının TKTTF ras qrupuna qarşı davamlılıq xromosomun 6 BL qolunda (Şəkil 1), SNP markerləri olan *IWB73072* (proksimal) və *IWB10724* (distal) arasında yerləşir.

Cədvəl 4. *Sr11* geni ilə assosiasiya təşkil edən diallel tipli *KASP_6BL_Tdurum contig 55744_822* markeri ilə aparılan qPZR-in nəticələri

N	Genotiplər	<i>Sr11</i> geni	
		Allel 1	Allel 2
1	Səba	+	-
2	Əlincə-84	+	-
3	Turan	-	-
4	Gilavar	-	-
5	Mirvari	+	-
6	Qaraqılçiq-2	+	-
7	Pərvin	-	-
8	Xəzri	+	-
9	Ləyaqətli-80	-	-
10	Fərəhim	+	-
11	Altun-2	-	-
12	Dağdaş	-	-
13	Əkinçi-84	-	-
14	Beltaqo	-	-
15	Pirşahin	+	-
16	Bərəkətli-95	-	-
17	Vüqar	-	-
18	Tərtər	-	-
19	Yaqut	-	-
20	Ruzi-84	-	-
21	Günəşli	-	-
22	Farandole	+	-
23	Qarabağ	-	-
24	Yeganə	-	-
25	Bəyaz	-	-
26	Mirbəşir-50	-	-
27	Qiymətli-2/17	-	-
28	Saratovskaya-29	-	-
29	Kollektivnaya-77	-	-
30	Dağdaş	-	-
31	Nurlu 99	-	-
32	Qırmızı buğda	-	-
33	Tigre	+	-
34	Tale 38	-	-

Cədvəl 5. *Sr11* geni ilə assosiasiya təşkil edən diallel tipli *KASP_6BL_BS0074288_51* markeri ilə aparılan qPZR-in nəticələri

N	Genotiplər	<i>Sr11</i> geni	
		Allel 1	Allel 2
1	Mirbəşir-50	+	-
2	Kollektivnaya-77	-	+
3	Saratovskaya-29	+	-
4	Qiymətli-2/17	+	-
5	Şəfəq	-	-
6	Tigre	-	+
7	Şirvan	-	-
8	Tale-38	-	+
9	Nurlu-99	-	-
10	Farandole	-	+



Şəkil 1. Buğdanın B genomunun 6-cı xromosomunda *Sr11* geninin lokalizasiyası (solda). 6BL xromosomunda *Sr11* geninin genetik əlaqə xəritəsi (sağda) (Olivera et al. 2015).

Bu iki marker *Sr11* ilə uyğun olaraq 0,7 və 0,3 məsafəsində lokalizasiya olunmuşdur (Bajgain et al., 2015). *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*-nin TKTTF ras qrupu 2013 və 2014-cü illərdə Efiopiya-yada Ug-99-a davamlı “*Digalu*”-da epidemiyaya səbəb olmuşdur (Olivera et al., 2015). *Sr11* geninin TKTTF rasına qarşı davamlılığı “*Gabo 56*” genotipində sübut edilmişdir. Nirmala və həmmüəlliflər “*Gabo 56*” və “*Chinese Spring*” buğdaları ilə aparılmış təcrübədə *Sr11* ilə ilişikli 7 tək nukleotid polimorfizm markerlərini aşkar ediblər. “*Berkut*”/ “*Scalavatis*” populyasiyasında *Sr11* üçün ayrılmış 5 SNP marker rəqabətli allel-spesifik polimeraz zəncir reaksiya (KASP) ilə təstiqlənmişdir (Nirmala et al., 2016).

Buğdanın rüşeym plazmasında *Sr26* geninin dominant STS markerlə təyini. Buğda genofonunda saxlanılan genotiplərin rüşeym plazması *Sr26* geninə görə yoxlanılmışdır. Bu məqsədlə buğdanın 6A xromosomunda *Sr26* genini identifikasiya etməyə imkan verən dominant *Sr26#43F/R* STS marker istifadə edilmişdir. Bu praymer *Sr26* geninə məlik olan genotiplərdə 207 bp ölçüsündə diagnostik ampikonun sintezinə cavabdehdir.

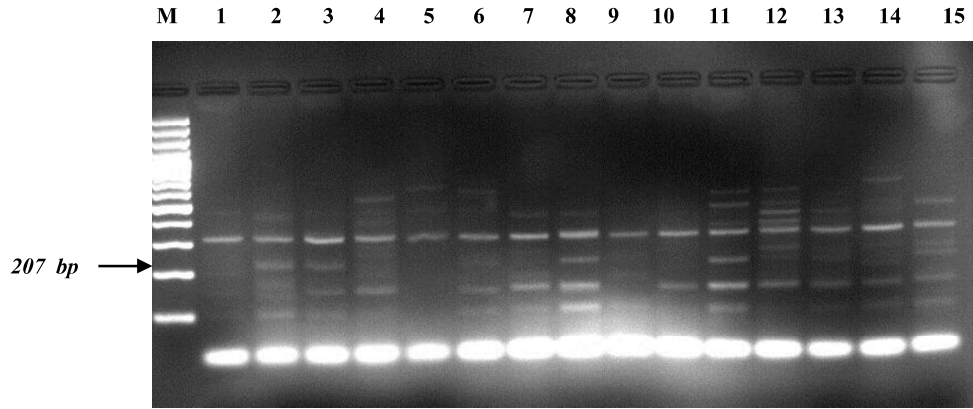
Tədqiqat zamanı 42 buğda genotipinin nüvə DNT-si ilə STS-PZR aparılmışdır. Amplifikasiya məhsullarının gel-elektroforez profilləri Şəkil 2-də göstərilmişdir. Şəkildən aydın olmuşdur ki, Qarabağ, Sarıçanaq-98, Ləyaqətli, Murov-2, Mironovka-808, Mirbəşir-128, Qiymətli-2/17, Əkinçi-84, Mirbəşir-50, 1st WEEERYT4, Günəşli buğda genotiplərində 207 n.c. uzunluğunda fraqmentlər amplifikasiya olunur. Bu fraqmentin *Sr26* üçün diaqnostik fraqment olduğunu nəzərə alaraq, belə bir nəticəyə gələ bilirik ki, yuxarıda adı çəkilən 11 buğda genotipinin 6A xromosomlarında *Sr26* geninin uyğun alleli mövcuddur. Tədqiq olunan genotiplərdən 31-də fraqment sintezi müşahidə olunmamışdır (Cədvəl 6).

Cədvəl 6. *Sr26* geni üçün spesifik dominant STS marker *Sr26#43* ilə aparılan PZR-in nəticələri

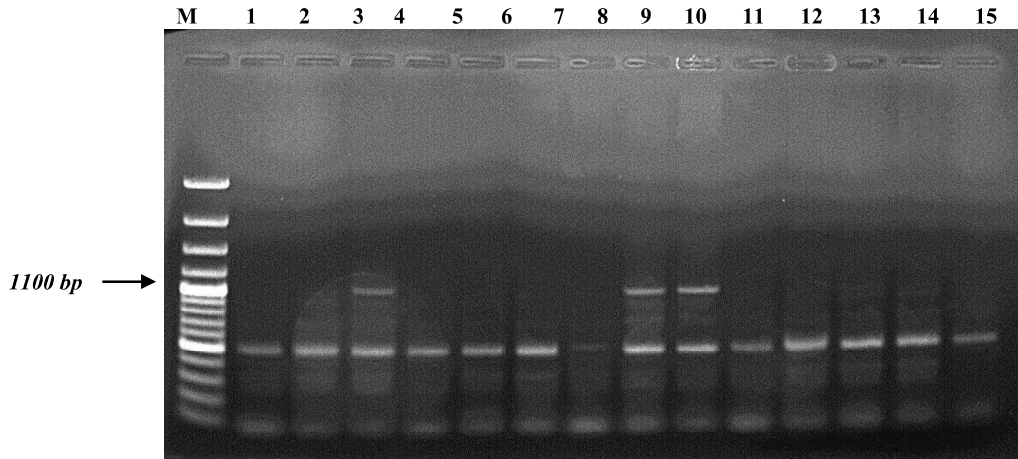
Nö	Genotiplər	207 bp	Nö	Genotiplər	207 bp
1	Bərəkatli-95	--	22	Qızıl buğda	--
2	Qarabağ	+	23	Zirvə	--
3	Sarıçanaq	+	24	Aran	--
4	Tərtər	--	25	Azəri	--
5	Şərq	--	26	Fərəhim	--
6	Mironovka	+	27	Mirbəşir-50	+
7	Saratovskaya-29	--	28	Farandole	--
8	Ləyaqətli	+	29	Tigre	--
9	Dağdaş	--	30	Qaraqılıç-2	--
10	Mirbəşir-128	+	31	Şiraslan-23	--
11	Murov	+	32	Renon	--
12	Qırmızıgül	--	33	Fransa	--
13	Əlinçə	--	34	Vüqar	--
14	Nurlu-99	--	35	1st WEEERYT4	+
15	Qiymətli-2/17	+	36	11thFAWWONN22	--
16	Əkinçi	+	37	A2	--
17	Əzəmətli-95	--	38	12thFAWWONN97	--
18	Tale-38	--	39	4th FEFWSN N50	--
19	Ruzi	--	40	Günəşli	+
20	Pirşahin-1	--	41	Pərzivan-2	--
21	Qırmızı buğda	--	42	Fatima	--

Sr26#43 dominant STS markeri *Sr26* genini identifikasiya etmək üçün işlənilib hazırlanmışdır (Mago et al. 2002) və bu markerdən marker asılı seleksiya proqramlarında (marker-assisted selection - MAS) istifadə olunur (Bariana et al. 2007).

2007-ci ildə Keniyada *Sr26* geninə virulent TTTSK rası aşkar edilmişdir. Ədəbiyyat məlumatlarında göstərilir ki, *Sr26* və *Sr25* davamlılıq genləri TTKST və TTTSK ras qruplarına qarşı effektivdir. Bu genlər TTKST və TTTSK rasları daxil olan TTKS qrupuna qarşı mübarizədə istifadə edilən bir neçə əsas genlər sırasındadır (Singh et al., 2006; Jin et al., 2007). Hər iki gen *Thinopyrum* (*Th*) *ponticum* (Podp.)-dan buğdaya köçürülmüşdür. *Sr26* daşıyan seqment 6A buğda xromosomu-



Şəkil 2. *Sr26* geni üçün Sr26#43 dominant STS praymeri ilə əldə edilmiş PZR məhsullarının 1,2%-li aqaroza gelində analizinin profilləri. Ox işarəsi 207 n.c.uzunluğunda DNT fraqmentini göstərir. M–DNT markeri-100 bp. 1–Bərəkətli-95, 2-Qarabağ, 3–Sarıçanaq 98, 4 – Tərtər, 5 – Şərqi, 6 - Miranovka 808, 7 – Saratovskaya-29, 8–Ləyaqətli, 9–Dağdaş, 10 - Mirbəşir 128, 11 - Murov 2, 12 – Qırmızı gül-1, 14 – Nurlu 99, 15 – Qiymətli-2/17.



Şəkil 4. Buğdanın 1BL.1RS translokasiyasında *Sr31* geni üçün spesifik iag95 praymerinin tətbiqi ilə əldə edilmiş PZR məhsullarının 1%-li aqaroza gelində analizinin profilləri. Ox işarəsi 1100 bp uzunluğunda DNT fraqmentini göstərir. M – DNT markeri -100 bp. 1 – Bərəkətli-95, 2 - Qarabağ, 3 – Sarıçanaq-98, 4 – Tərtər, 5 – Şərqi, 6 – Miranovka- 808, 7 – Saratovskaya-29, 8 – Ləyaqətli, 9 – Dağdaş, 10 - Mirbəşir-128, 11 – Murov-2, 12 – Qırmızı gül-1, 13–Əlinc-84, 14 –Nurlu- 99, 15 – Qiymətli-2/17.

nun uzun qoluna köçürülmüşdür (Şəkil 3) və Avstraliyada davamlılıq mənbəyi kimi istifadə edilir (Friebe et al., 1994). Buğdaya bu genin köçürülməsi nəticəsində qısaltılmış yad seqment ilə yeni xətt inkişaf etdirilmiş və bu zaman məhsul itkisi baş verməmişdir.

Əldə olunmuş PZR profillərindən görünür ki, axtarılan 207 bp uzunluqda olan fraqmentdən əlavə müxtəlif ölçülü digər fraqmentlər də sintez olunmuşdur. İstifadə edilən buğda genotiplərinin əksəriyyətində 303 bp ölçüsündə DNT fraqmentləri aydın görünür. Bu fraqmentlərin izahını vermək üçün ko-dominant markerlərdən istifadə edilməsi məqsəduyğun sayılır. Homoziqotları heteroziqotlardan ayırmaq üçün ko-dominant markerlərə ehtiyac du-

yulduğundan *Sr26* geni üçün ko-dominant markerlər test edilmişdir. Həmçinin, 6AL xromosomuna spesifik 5 markerin heç biri *Eagle* buğdasının PZR məhsulunda amplifikasiya olunmamışdır. *Sr26* geninin heteroziqot və homoziqot olmasını fərqləndirmək üçün 6AL-spesifik BE518379 və SR26 markerləri Sr26#43 markeri ilə birlikdə multipleks halda istifadə olunmaqla PZR aparılmışdır. 6AL-spesifik markeri BE518379 sürətli işləmiş və 303 bp uzunluğundakı allel Sr26#43 markeri tərəfindən amplifikasiya olunmuş 207 n.c.uzunluğundakı fraqmentlərdən aqaroza gelində aydın ayrılmışdır. Əlavə buğda xətlərini genotipləşdirmək üçün BE518379 və Sr26#43 praymerləri bərabər miqdarda kombinə edilmişdir.

Cədvəl 7. *Sr31* geni üçün spesifik iag95 praymeri ilə aparılan PZR-in nəticələri.

Nö	Genotiplər	1100 bp	Nö	Genotiplər	1100 bp
1	Bərəkətli-95	--	22	Qızıl	--
2	Qarabağ	--	23	Zirvə- 85,	+
3	Sarıçanaq- 98	--	24	Aran	+
4	Tərtər	--	25	Azəri	--
5	Şərqi	--	26	Fərəhim	--
6	Miranovka- 808	--	27	Mirbaşir- 50	--
7	Saratovskaya- 29	+	28	Farandole	--
8	Ləyaqətli	--	29	Tigre	--
9	Dağdaş	--	30	Qaraqılçiq-2	--
10	Mirbaşir- 128	--	31	Şiraslan- 23	--
11	Murov	--	32	Renon	--
12	Qırmızı gül- 1	+	33	Fransa	--
13	Əlinca- 84	--	34	Vüqar	--
14	Nurlu- 99	+	35	1st WWEERYT4	--
15	Qiyətli- 2/17	--	36	11thFAWWONN22	--
16	Əkinçi - 84	--	37	A2	--
17	Əzəmətli- 95	--	38	12thFAWWONN97	+
18	Tale- 38	+	39	4th FEFWSN N50	--
19	Ruzi- 84	--	40	Günəşli	+
20	Pirşahin- 1	--	41	Pərvizvan- 2	--
21	Qırmızı buğda	--	42	Fatima	--

Buğdanın 1BL.1RS translokasiyasında *Sr31* geninin spesifik İag95 praymeri ilə identifikasiyası. Buğda genotiplərində 1BL.1RS translokasiyasında yerləşən Lr26-Sr31-Yr9 lokusu spesifik İag95 praymeri ilə yoxlanılmışdır. Aparılan PZR nəticələrinin gel-elektroforetik profilləri şəkil 4-də göstərilmişdir. İag95 praymeri 1100 bp ölçüsündə amplikonun sintezi üçün cavabdehdir. Şəkildən görüldüyü kimi, 8 buğda genotipində gözlənilən fraqmentlər amplifikasiya olunmuşdur. Bu nəticə onu göstərir ki, Saratovskaya-29, Qırmızı gül-1, Nurlu-99, Tale-38, Zirvə-85, Aran, 12th FAWWON N97, Günəşli genotiplərinin genomlarında 1BL.1RS translokasiyasında *Sr31* geni mövcuddur. Digər 24 buğda genotipində isə *Sr31* geni aşkar olunmamışdır (Cədvəl 7).

Son zamanlar inkişaf etdirilmiş Sec-1 lokusunu daşımayan, 1RS-i daşıyan buğda-çovdar rekombinant xətləri çovdardan gövdə pası davamlılığını keyfiyyət itkisi olmadan köçürməyə imkan verir (Lukaszewski, 2000). Gövdə pasına qarşı davamlılıq geni daşıyan çovdar seqmenti üçün PZR əsaslı markerlərin dizayn etdirilməsi bu genlərin köçürülməsinə imkan yaradacaqdır. Bu artıq gövdə pasına davamlılıq geni daşıyan xətlərə çovdar seqmentinin köçürülməsi zamanı da vacibdir. İag95 praymeri 1RS xromosomunda lokalizasiya olunan *Sr31* geninin 1100 bp uzunluğunda DNT fraqmentlərinin amplifikasiyası üçün dizayn olunmuşdur. *Sr31* gövdə pası davamlılıq geni çovdar bitkisinin 1-ci xromosomunun qısa qolunda yerləşir. Bu gen Avstraliyada gövdə pası patogeninə qarşı effektiv şəkildə istifadə olunur. *Sr31* üçün hazırlanan 1BL.1RS (Pavon wheat/Petkus rye) və ya 1DL.1RS (Gabo

wheat/Imperial rye) markerləri translokasiya xromosomu olan buğda genotiplərinin ilkin identifikasiyası üçün istifadə edilmişdir. Daha sonra bu markerlər 1RS qolunun sadəcə bir hissəsini daşıyan buğda-çovdar rekombinant xətlərində olan xüsusi seqmentlər üçün spesifik olaraq hazırlanmışdır.

Beləliklə, müasir molekulyar-bioloji metod və texnologiyalar tətbiq olunmaqla buğda genotiplərində *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* patogenə qarşı effektiv davamlı *Sr* genlərini identifikasiya etməklə, yerli sortların genetik cəhətdən davamlılıq potensialını qiymətləndirmək mümkündür. Alınan nəticələr gələcəkdə müxtəlif seleksiya proqramlarında istifadə oluna bilər.

ƏDƏBİYYAT

- Bajgain P., Rouse M.N., Bulli P. et al.** (2015) Association mapping of North American spring wheat breeding germplasm reveals loci conferring resistance to Ug99 and other African stem rust races. *BMC Plant Biol.*, **15**: 249 (19 p.).
- Baranova O.A., Lapochkina I.F., Anisimova A.V. et al.** (2016) Identification of Sr genes in new common wheat sources of resistance to stem rust race Ug99 using molecular markers. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, **6(3)**: 344-350.
- Beard C., Jayasena K., Thomas G., Loughman R.** (2006) Managing stem rust of wheat. *Plant Pathology, Department of Agriculture. Western Australia: Farmnote 73/2004.*
- Friebe B., Jiang J., Knott D.R., Gill B.S.** (1994) Compensation indexes of radiation-induced wheat *Agropyron elongatum* translocations conferring resistance to leaf rust and stem rust. *Crop Sci.*, **34**: 400-404.
- Huseynova I.M., Ibrahimov E.R., Rustamova S.M., Hajiyeva A.T., Sadigov Sh.F., Aghayeva D.N., Szabo L.J., Aliyev J.A.** (2016) Molecular Study Of Pgt Races In Azerbaijan. *International Conference "Innovative Approaches to Conservation of Biodiversity" dedicated to the 80th Anniversary of the Institute of Botany, Azerbaijan National Academy of Science*, p. 151.
- Jin Y., Singh R.P., Ward R.W., Wanyera R., Kinyua M., Njau P., Pretorius Z.A.** (2007) Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic Sr gene lines to race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Dis.*, **91**: 1096-1099.
- Leonard K.J., Szabo L.J.** (2005). Stem rust of small grains and grasses caused by *Puccinia graminis*. *Molecular plant pathology*, **6(2)**: 99-111.
- Lukaszewski A.J.** (2000) Manipulation of the 1RS. 1BL translocation in wheat by induced homoeologous recombination. *Crop Sci.*, **40**: 216-225.

- Mago R., Spielmeier W., Lawrence G.J., Lagudah E.S., Ellis J.G., Pryor A.** (2002) Identification and mapping of molecular markers linked to rust resistance genes located on chromosome 1RS of rye using wheat-rye trans-location lines. *Theor. Appl. Genet.*, **104(8)**: 1317-1324.
- Murray M.G., Thompson W.F.** (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*, **8(19)**: 4321-4326.
- Nirmala J., Chao S., Olivera P. et al.** (2016) Markers linked to wheat stem rust resistance gene Sr11 effective to *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* race TKTF. *Phytopathology*, **106(11)**: 1352-1358.
- Oliveira P., Newcomb M., Szabo L.J. et al.** (2015) Phenotypic and genotypic characterization of race TKTF of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* that caused a wheat stem rust epidemic in Southern Ethiopia in 2013-2014. *Phytopathology*, **105(7)**: 917-928.
- Schumann G.L., Leonard K.J.** (2011) Stem rust of wheat (black rust). *The Plant Health Instructor*.
- Sears E.R.** (1966) Chromosome mapping with aid of telocentrics. *Proc. of 2nd Int. Wheat Genet. Symp. Hereditas Suppl.* Sweden: Lund, p. 370-381.
- Singh R.P., Hodson D., Huerta-Espino J. et al.** (2008) Will stem rust destroy the world's wheat crop? *Advances in Agronomy*, **98**: 272-309.
- Singh R.P., Hodson D.P., Jin Y., Huerta-Espino J.** (2006) Current status, likely migration and strategies to mitigate the threat to wheat from race Ug99 (TTKS) of stem rust pathogen. *CAB Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour.*, **1**: 1-13.
- Singh R.P., Huerta-Espino J., Roelfs A.P.** (2002) The wheat rusts. *Bread Wheat: Improvement and production, FAO Plant Production and Protection Series, No. 30.*
- Yu G., Champouret N., Steuernagel B.** ((2017) Discovery and characterization of two new stem rust resistance genes in *Aegilops sharonensis*. *Theor. Appl. Genet.*, **30(6)**: 1207-1222.
- Yu L.-X., Barbier H., Rouse M.N. et al.** (2014). A consensus map for Ug99 stem rust resistance loci in wheat. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, **127(7)**: 1561-1581.

Идентификация Генов *Sr11*, *Sr26* и *Sr31* Эффективной Устойчивости к Расе Стеблевой Ржавчины TKTF у Генотипов Пшеницы в Условиях Азербайджана

С.М. Рустамова, А.Е.Гаджиева, Ш.Ф. Садыгов, А.Ч. Мамедов, И.М. Гусейнова

Институт молекулярной биологии и биотехнологий НАН Азербайджана

Впервые с применением технологии генотипирования KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) исследована зародышевая плазма пшеницы и дана характеристика генетических источников эффективной устойчивости против распространенной на территории Азербайджана стеблевой ржавчины расовой группы TKTF. В результате анализов ПЦР (ОТ-ПЦР) в реальном времени, проведенных с использованием диаллельного праймера KASP_6BL_BS0074288_51, в 6В хромосоме 9 из 34 генотипов, а при использовании праймера KASp_6BL_Tdurum_contig55744_822 - 7 из 10 генотипов идентифицирован ген *Sr11*. При проведении ПЦР с использованием доминантного STS маркера Sr26#43, в 11 из 42 генотипов выявлен фрагмент размером 207 н.п., считающийся диагностическим ампликоном гена *Sr26*. При использовании специфического праймера *İag95* для анализа, расположенного в 1BL.1RS транслокации локуса Lr26-Sr31-Yr9 в 8 из 42 генотипов выявлено наличие продуктов синтеза ПЦР длиной 1100 н.п., характерных для гена *Sr31*.

Ключевые слова: Пшеница, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, *Sr11*, *Sr26*, *Sr31*, KASP-генотипирование, ОТ-ПЦР

Identification Of *Sr11*, *Sr26* and *Sr31* Genes Effective Resistant To Stem Rust Rase TKTTF in Wheat Genotypes in Azerbaijan

S.M. Rustamova, A.T. Hacıyeva, Sh.F. Sadigov, A.Ch. Mammadov, I.M. Huseynova

Institute of Molecular Biology and Biotechnologies, Azerbaijan National Academy of Sciences

For the first time wheat germplasm has been examined and gene sources effective resistant to TKTTF ras group of stem rust spread in Azerbaijan have been characterized using KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) genotyping technology. Real-time PCR (RT-RCR) analysis with diallel-type KASP_6BL_BS0074288_51 primer identified *Sr11* gene on 6B chromosome of 9 wheat genotypes from 34 ones, and it was identified in 7 genotypes from 10 ones when using KASp_6BL_Tdurum contig55744_822. A fragment of 207bp, which is considered to be the diagnostic amplicon for the *Sr26* gene has been synthesized in 11 wheat genotypes from 42 ones as a result of PCR performed with a dominant STS marker Sr26#43. Lr26-Sr31-Yr9 locus located in 1BL.1RS translocation of 42 wheat genotypes was analyzed using specific Iag95 primer and 1100 bp PCR products, characteristic of *Sr31* gene were found to be synthesized in 8 genotypes.

Keywords: *Wheat, Puccinia graminis f. sp. tritici, Sr11, Sr26, Sr31, KASP-genotyping, RT-PZR*