

Araştırma Makalesi/Research Article (Original Paper)

Dayanıklı R55 (6AL/6VS) Translokasyon Hattı İle Lokusa Özel SSR Markerleri Kullanılarak Endemik Tir Buğday (*Triticum aestivum* L. ssp. *vulgare* Vill. v. *Leucospermum* Körn) Genotipinin Yr-26 Sarı Pas Hastalık Direncinin Değerlendirilmesi

M. Alp FURAN^{1*}, Merve Dilek GEBOLOĞLU¹, Diğdem ARPALI²

¹Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji, Van, Türkiye

²Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri, Van, Türkiye

*e posta: alpifuran@yyu.edu.tr; Tel: +90530 349 2709

Özet: Buğday, dünyadaki en önemli besin ürünüdür ve insan yerleşiminden bu yana önemli bir ürün olarak yetiştirilmektedir. Endemik buğday genotipleri, hastalıklara karşı direnç açısından farklı kaynak genlerine sahip olabilirler. Bununla birlikte, birçok çiftçi ulusal ve uluslararası ıslah programlarından çıkan modern çeşitleri yetiştirmektedir. Önceki çalışmalar, bu çeşitlerin bazılarının bir veya daha fazla hastalığa karşı direncinin olmadığını göstermiştir. Bu nedenle, çeşit zenginliği programı yerel ve egzotik buğday çeşitlerinin potansiyel donör ebeveynleri olarak değerlendirilmesine yönelik bir girişimdir. Bu çalışma için Türkiye’de Van ve çevresinde sıklıkla yetiştiriciliği yapılan lokal bir genotip olan Tir Buğdayının sarı pas direnci moleküler düzeyde incelenmiştir. Basit ve pratik bir yaklaşım olarak Xgwm (Gatersleben wheat microsatellite) ve Xbarc (Beltsville agricultural research) tarafından belirlenmiş YR direnç genleri ile bağlantılı olduğu bilinen ve kromozom üzerindeki ilgili gen bölgeleri ile yakın ilişkili olan SSR markerleri ile hastalık direnç genlerine sahip sarı pasa dayanıklılık geni Yr-26’yı barındırdığı bilinen R55 (6AL/6VS) translokasyon hattı ile Yr-1, Yr-7, Yr-3a ve Yr-4a dayanıklılık genlerini taşıdığı bilinen yakın izogenik hatlar bakımından incelenmiştir. Gözlenen pas okumaları sonucu Cobb skala değeri “MS” orta duyarlı olarak belirlenmiştir. Kullanılan SSR primerleri toplam 212 polimorfik bant vermiş ve Ortalama polimorfik bant sayısı primer başına 5.2 olurken, değerlendirmeye alınmış primerlerin polimorfik bilgi içerikleri ise 0.37 ile 0.41 arasında değişiklik göstermiştir. Lokal Tir genotipinin Yr-2 ve Yr-3b,4b dayanıklılık genlerini barındırdığı bilinen genotiplerle yakın ilgisi olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Sarı pas, SSR, Tir buğdayı, Yr-26

Evaluation of Yr-26 Yellow Rust Disease Resistance of Endemic Tir Wheat (*Triticum aestivum* L. ssp. *Vulgare* Vill.v. *Leucospermum* Körn) Genotypes Using Resistant R55 (6AL / 6VS) Translocation Line and Locus Specific SSR Markers

Abstract: Wheat is the most important food product in the world and has been cultivated as an essential product since human settlement. Endemic wheat genotypes may have different source genes in terms of resistance to diseases. However, many farmers cultivate modern varieties resulting from national and international breeding program. Previous studies have demonstrated that some of these varieties are not resistant to one or more diseases. Therefore, a rich variety program is an attempt to make an assessment the potential donor of local and exotic varieties of wheat. In this study, yellow rust resistance of Tir wheat has been studied at the molecular level which is a local genotype frequently cultivated in Van Lake Basin in Turkey. As a simple and practical approach, R55 (6AL / 6VS) translocation line that contains yellow rust resistance gene Yr-26 and Near Isogenic Lines which having known the disease resistance genes Yr-1, Yr-7, Yr-3 and Yr-4 were examined using the SSR markers identified by Gatersleben Wheat Microsatellite (Xgwm) and Beltsville Agricultural Research (Xbarc) which is known to be associated with YR resistance genes and closely related to the respective gene regions on the chromosome. Observed rust, surveying was determined as medium sensitive "MS" according to the Cobb scale value. Totally 212 polymorphic bands obtained from the using SSR primers and the mean number of the polymorphic band found as 5.2 for each primer and the polymorphic information content of the evaluated primers varied between 0.37 and 0.41. The local Tir genotypes have found to be closely related to genotypes known having the yr-2 and yr-3b, 4b resistance genes.

Keywords: Stripe rust, SSR, Tir wheat, Yr-26

Giriş

Ülkemizde buğdayda en yaygın olan pas hastalığı sarı pasdır. Epidemiy olduğu yıllarda özellikle hastalığa hassas çeşit ekildiğinde %30-40'lara varan verim kaybına neden olmaktadır. Verim kaybının yanında tanelerin kırışık ve cılız olmasına yol açtığı için kalite değerini de azaltmaktadır. Van Gölü ve çevresinde yaygın olarak yetiştirilen Tir buğdayı kendi ekolojisinde yüksek bir verim potansiyeline sahiptir. Popülasyon olması nedeniyle Tir buğdayı bir çok özellik bakımından geniş varyasyon göstermektedir.

İklim koşullarının kültür bitkileri çeşitliliğini sınırladığı bölgede buğday, insanlar için en önemli beslenme ve geçim kaynağıdır. Yöreyle zaman zaman getirilen değişik çeşitler, yıllar içinde kararlılık göstermemiş, bazı yıllar kıştan tümüyle zarar görmüşlerdir. Tir buğdayı ise Van Gölü havzasında çok uzun zamandan beri yetiştirilen popülasyon özellikli bir yerel hatıdır. Soğuğa ve hastalıklara dayanıklı olmasına karşın popülasyon içindeki düşük verimli genotipler ortalama verimi düşürmektedir. Bu nedenlerden dolayı bölgeye iyi uyum sağlamış Tir popülasyonunu incelemek ve üstün popülasyonları seçmek son derece önemlidir. Tahıllarda hastalıklara neden olan birçok organizma içinde en önemli ve verimi sınırlayıcı olanlar patojenik mantarlardır. Bunlardan puccinia (pas), ustilago (rastık), tilletia (sürme), erysiphe (külleleme) septoria (septorya), alternaria (alternarya), helminthosporium (helminthosporium), fusarium (fuzaryum) ve pythium (pityum) en yaygın olanlardır. Sık görülürler ve dünya çapında potansiyel tehlikedirlere. Bu hastalıkların dağılışı ve nispi önemi üzerinde yapılan çalışmalar, özellikle buğdayda olmak üzere pasların diğerlerinden daha fazla önemli olduğunu göstermiştir. *Puccinia graminis* (sap pası ya da kara pas), *Puccinia recondita* (yaprak pası ya da kahverengi pas), *Puccinia striiformis* (şeritli pas ya da sarı pas) *Puccinia hordei* (yaprak pası, bodurlaşma yapar) ve *Puccinia coronata* (taç pası) düzenli olarak buğday, arpa, yulaf ve çavdarda önemli kayıplara neden olmaktadır.

Dünyanın önemli tahıl üretici ülkelerinde verimliliği kısıtlamadaki büyük rolleri nedeniyle paslar özel ve detaylı bir dikkat gerektirmektedir (Kınacı 1992). Pas hastalıkları bilinen en eski ve üzerinde en çok çalışılan bitki hastalıkları arasında yer alır. Buğdayda üç çeşit pas hastalığı görülür: kara pas, kahverengi pas ve sarı pas. Bu hastalıkların her birisine pas fungusunun özel türleri sebep olmaktadır. Pas hastalıkları konukçu oldukları bitkilerde benzer semptomlar oluştururlar ve bitkide yapacakları enfeksiyonlar için benzer gereksinimleri vardır (Marsalis ve Goldberg 2006). Sarı pas hastalığının genetik olarak kendini kolayca değiştirebilme yeteneğinde olması, bu hastalığın dinamik bir şekilde izlenerek yeni gen kaynaklarının bulunmasını zorunlu kılmaktadır. *Dasyphyrum villosum* (L.) Candargy (sin: *Haynaldia villosa* Schur) buğdayın uzak bir akrabası olup, dayanıklılık ve kalite genleri bakımından önemli bir kaynaktır (De Pace ve ark. 1998). *D. Villosum*'un altı kromozomu buğdaya eklenmiş olup, buğdayın 6A kromozomunun uzun kolu ile 6V kromozomunun kısa kolu arasında bir translokasyon (6VS/6AL) hattı elde edilmiştir (Chen ve ark. 1995). Bu translokasyon hattının Amerika'nın Kuzey Batı Pasifikteki bütün sarı pas ırklarına karşı dayanıklı olduğu tespit edilmiş ve dayanıklılık geni Yr-26 olarak adlandırılmıştır (Yıldırım ve ark. 2000).

Yr-26 geninin teorik olarak Türkiye'deki sarı pas ırklarına karşı da dayanıklılık sağlayacağı tahmin edilmektedir. Bu varsayımın en büyük kanıtı Orta Anadolu koşullarında saptanan üç sarı pas dayanıklılık geninin (Yr-1, Yr-4, Yr-10) (Çetin ve ark. 1995) virulent olan pas ırklarına ve Seri-82 çeşidinin sahip olduğu Yr-9 genini aşmış bulunan pas ırkına karşı ABD'de yapılan deneylerde Yr-26'nın tam bir dayanıklılık göstermesidir (Yıldırım ve ark. 2000). Van Gölü ve çevresinde yetiştirilen Tir buğday popülasyonları üzerine daha önce yapılmış sarı pas hastalığına karşı dayanıklılık çalışmalarında Yr-2, Yr-6, Yr-7 ve Yr-9 (Sönmez ve ark. 2002) dayanıklılık genlerinin virulent olan ırklar ile hastalık reaksiyonları gözlenen Tir buğday popülasyonlarında hastalığa dayanıklılık durumlarının genotiplere göre değiştiği görülmektedir. Ma ve ark. (2001) hem sarı pas hem de külleleme hastalığına dayanıklılık sağlayan buğday-*Haynaldia villosa* 6AL.6VS translokasyon hatlarından R55 ile duyarlı çeşit Yumai 18 arasında yapılan melezin F₂ popülasyonunu kullanmışlardır. Sarı pas dayanıklılığın tek bir dominant gen tarafından idare edildiğini ve bu genin Yr26 olduğunu düşünen araştırmacılar söz konusu genin lokasyonunu 6VS olarak belirtmişlerdir. Bulk Segregant Analizi ve mikrosatelit primerlerini kullanarak belirtilen F₂ popülasyonunda 1B mikrosatelit lokus markörlerini (*Xgwm11*, *Xgwm18*, *Xgwm413*) Yr26'ya çok yakın olduğunu belirtmişlerdir. Yr26, *Xgwm11/Xgwm18* markörlerinden 1.9 cM uzaklıkta, *Xgwm413*'den de 3.2 cM uzaklıkta lokalize olmuştur. Sonuç olarak Yr26 geninin 1B kromozomunun kısa kolunda lokalize olduğunu saptamışlardır. Ayrıca Yr26 geninin orjinini ve dağılımını incelemek için kalıtımını ve moleküler markör analizini araştırmışlar ve Yr26 geninin *T. turgidum* L.'den geldiğini belirtmişlerdir. PCR'a dayalı mikrosatellit markörlerinin açılma gösteren bir popülasyonda Yr26 genini belirlemek için çok etkili bir yöntem olduğunu ve buğday ıslahında uygulanabileceğini saptamışlardır.

Genetik ve bitki ıslahı için buğdayın (*T. aestivum* L. Em. Thell) genetiğinin ve genom organizasyonu, kullanılan moleküler markörlerin oldukça önemli bir değere sahip olduğunu göstermektedir. A,B ve D olmak üzere ve %80'den fazla repetitive DNA'sı ile (16x10⁹ bp/1C) 3 büyük genoma sahiptir ve (2n = 6x = 42) allohexaploidtir.

Buğdayın 7 homolog grubunun tamamı için fiziksel haritaları ve detaylı RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) linkage haritaları çıkarılmıştır. Tüm bunlara rağmen buğdayın genetik haritasının yapılandırılmasındaki işlemler durağan kalmıştır. Gen haritalandırmasında RFLP markörünün kullanımı, buğdaydaki polimorfizm seviyesinin çok sınırlı olması sebebiyle yavaş olmuştur. Gen ve genom haritalaması kapsamlı yapılmış melezlemelerden elde edilen popülasyonların kullanımını gerektirir. Bununla beraber agronomik açıdan önemli birçok gen veya QTL (Quantitative trait loci)'nin haritalanması bitki ıslahında başlıca hedefdir ve intraspesifik anlamda markör bilgisi gerektirir. Bu özellikle MAS (Marker Assisted Selection) için geçerlidir (Röder ve ark. 1998).

Mikrosatellit analizleri PCR (polymerase chain reaction)'ye dayanır. RFLP analizlerinden çok daha kolay uygulanır ve otomasyon uyumluluğu oldukça yüksektir. Bitkilerde mikrosatellitler yüksek oranda bilgi sağlayıcıdır. Multiallelik olmaları sebebiyle birçok bitkide lokusa özel markörlerdir. Evrim çalışmalarında yüksek potansiyele sahiptirler ve filogenetik çalışmalar için kullanılmaktadırlar. Mikrosatellitler hexaploid ekmeklik buğdayda diğer Markör sistemlerinden çok daha yüksek polimorfizm seviyesi gösterirler ve daha fazla bilgi sağlayıcıdır. Bununla beraber genom büyüklüğünden dolayı buğdayda mikrosatellitlerin geliştirilmesi ekstra zaman kullanımına ve yüksek maliyete gereksinim duyar. Bu gibi markörler çoğunlukla ko-dominant kalıtım gösterir ve çoğu durumda kromozoma özeldir. Bu özellik hexaploid genom için faydalıdır. Hexaploid ekmeklik buğday dünyadaki en önemli bitkilerden biridir ve intraspesifik polimorfizm çok düşüktür. Geliştirilmiş primer setlerinin çoğu (%80) genom spesifiktir ve ekmeklik buğdayın 3 büyük genomunun (A, B ve D) sadece birindeki tek bir lokusu belirler. Markörler birkaç sentrometrik bölgedeki gruplandırma ile linkage haritası boyunca tesadüfi dağıtılmıştır (Röder ve ark. 1998).

SSR'lar değişken, ko-dominant ve PCR tabanlı moleküler markörlerdir. Böylelikle bunlar geliştirilebilir ve genetik haritaların kurulmasında geniş ölçüde kullanılabilirler. Mikrosatellitler geniş ölçüde, genetik farklılığın tahmininde ve marköre dayalı seleksiyonlarda kullanıcı rahatlığı, lokusa özel ve yüksek polimorfik olmaları sebebiyle prinç, mısır ve arpada oldukça yaygın kullanım alanına sahiptirler.

Araştırmacılar, Avrupa buğday çeşitlerinin özellikle kışlık tipler olmak üzere 502 çeşidinin yer aldığı bir veri tabanı kurmuşlardır ve farklı coğrafik bölgelerde birçok mikrosatellit için relativ allel frekansı çeşitlendirilmiştir (Röder ve ark. 2002).

Yıldırım ve ark. (2000) yaptıkları bir çalışmada 6VS/6AL translokasyon hattının Amerika'nın kuzey batı Pasifikteki bütün sarı pas ırklarına karşı dayanıklı olduğunu ve bu dayanıklılığın Yr-26 geni tarafından kontrol edildiğini belirtmişlerdir. Yapılan bu çalışmada fenotipik ve moleküler genetik analizleri ile bölge çiftçisinin yıllardır kullanmış ve hâlihazırda karışık köy popülasyonları olarak kullanmakta olduğu Tir buğdayının hastalık dirençleri NCBI (National Center For Biotechnology Information) veri tabanından taranarak önceden yayınlanmış ilgili gen bölgeleriyle yakın bağlantılı GWM (Gatersleben wheat microsatellite) primerleri kullanılarak incelenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Van Gölü ve çevresinde yaygın olarak ekimi yapılan, Tir buğday popülasyonları ile CIMMYT'ten temin edilen sarı pasa dayanıklılık geni Yr-26'yı barındırdığı bilinen R55 (6AL/6VS) translokasyon hattı ile Yr-1, Yr-7, Yr-3a ve Yr-4a dayanıklılık genlerini taşıdığı bilinen Chinese 166, Lee ve Vilmorin 23 ve diğer dayanıklı yakın izogenik hatları (near isogenic line) oluşturmuştur. Araştırmada kullanılan dayanıklı R55 translokasyon hattının özellikleri; Genom lokalizasyonu 1B (6AL/6VS), Barındırdığı dayanıklılık geni Yr-26, Orijinal kaynağı :Haynaldia villosa (Daspyrum villosum), Test popülasyonlarındaki diğer genler R43, R64, R77, Gen referansı (Yıldırım, A. et al, Plant Disease 84:40-44) ve (Ma, J. et al, Euphytica 120: 219-226)

Araştırmada kullanılan Tir buğday popülasyonları (Triticum aestivum L. ssp vulgare Vill. v. leucospermum Körn) ise Erciş 30/1, Erciş 60/1, Amik-M3, Adilcevaz, Merkez-Edremit bölgelerinden toplanmış ve yöre çiftçisi tarafından uzun yıllardır kullanılmakta olan genotiplerden oluşmaktadır. Dayanıklılık genleri belirlenmiş yakın izogenik hatlar ve gen referansları Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan yakın izogenik hatlar ve gen referansları

Yakın izogenik hat	Genom lokalizasyonu	Barındırdığı dayanıklılık geni	Gen referansı
Chinese 166	2A	Yr-1	Lupton, FGH and Macer, RCF, Trans Br Mycol Soc 45:21-45
Lee	2BL	Yr-7	Macer, RCF, Hereditas Suppl 2:127-142
Vilmorin-23	6A	Yr-3a, Yr-4a	Chen, XM and Line, RF, Personal communication
StrubesDickopf	D	Yr-2,3,4	Stubbs, RW, Personal communication
Suwan92xOmar	2B	Su92	Chen, XM and Line, RF, Personal communication
Clement	4B	Yr-9+1	Chen, XM and Line, RF, Personal communication
Hybrid-46	1B-6B	Yr-3b, Yr-4b	Lupton, FGH and Macer, RCF, Trans Br Mycol Soc 45:21-45
Heines Peko	7B	Yr-6+	Stubbs, RW, Personal communication
CarstensV	2AS	Yr-32	Luo et al. 2005 Phytopathology 95:1266-1270
Reicherberg 42	2BL	Yr 7 +1	Johnson et al. 1972, Singh et al. 1990
Heines VII	7B	Yr-2+1	Lupton, FGH and Macer, RCF, Trans Br Mycol Soc 45:21-45) (Ma et al. 2001 Euphytica 120:219-226

Yöntem

Sarı pas inokülasyonu

Araştırmada kullanılacak Tir buğday popülasyonları ve son yıllarda ön plana çıkan Yr26 pas ırkına karşı dayanıklılık geni barındıran R55 nolu translokasyon hattı, patojen inokülasyonu amacıyla büyütme odasında çimlendirmeye alınmıştır. Çalışmanın temelini oluşturan bitki materyali içerisindeki her bir genotipten ortalama 30 adet tohum çimlendirilerek iki yapraklı döneme ulaşıncaya kadar yetiştirilmiştir. Daha sonra fideler 10 °C sıcaklık ve % 95 nem koşulları sağlanarak inokülasyonlar gerçekleştirilip 24 saat süre ile bu ortamda bırakılmışlardır. İnokülasyonu takiben bitkiler gece-gündüz sıcaklık değişimi 5 ve 20 °C olacak şekilde 16 saat ışıktanmaya tabii tutulmuşlardır. Enfeksiyonları 18-24 gün sonra iki defa hastalık okuması yapılarak genotiplerin hastalık reaksiyonları gözlenmiştir. Hastalıklı doku yüzdeleri Peterson ve ark. (1948) göre tahminlenmiştir ve oluşan enfeksiyona karşı konukçu reaksiyonları Roelfs ve ark. (1992) göre belirlenmiştir. Yaprak pası için “R” küçük boyutta Uredinia spore ile çevrili dirençli, “MR” orta derece dirençli ya da küçükten orta büyüklüğe kadar sporla çevrelenmiş nekrotik yada klorotik doku, “MS” orta duyarlı yada nekrotik veya klorotik doku olmaksızın orta büyüklükte Uredinia gelişimi ve “S” duyarlı yada nekroz veya kloroz olmaksızın büyük boyutlu Uredinia spor oluşumu göstermektedir.

DNA izolasyonu

Çalışmada Tir buğday popülasyonlarının, R55 translokasyon hattının ve Chinese-166, Lee ve Vilmorin-23 yakın izogenik hatların her birinden ortalama 20 adet tohum iklim odasında viyollere ekilmiştir. Bitkiler iki yapraklı döneme ulaşıncaya her bir genotipe ait yaprak örnekleri ayrı ayrı alınarak DNA izolasyonuna kadar -80 °C’de muhafaza edilmiştir. DNA eldesi Doyle ve Doyle (1987)’in bildirdiği yöntemle yapılmıştır. İzole edilen çift iplikli DNA miktarının tayini Thermo NanoDrop 2000 cihazında yapılmış stok DNA’lardan 10 ng/µl olacak şekilde seyreltilmiş DNA’lar hazırlanarak PCR analizlerinde kullanılmıştır. Karışık popülasyon olarak yetiştirilen Tir Genotipleri arasında gerçekleştirilmiş olan moleküler markör analizleri için Tir popülasyonuna ait 10 bitkinin DNA’sı eşit miktarlarda alınıp bulk haline getirilmiştir.

Moleküler karakterizasyon

Van Gölü havzasının farklı lokasyonlardan toplanmış Tir buğday popülasyonlarının sarı pas (*Puccinia striiformis* f. sp. *Tritici*) hastalığına karşı direnç durumları ve olası dayanıklılık allel durumlarının belirlenebilmesi için Yr-26 dayanıklılık geni taşıyan R55 translokasyon hattı ve Yr-1, Yr-7, Yr-3a ve Yr-4a allellerini barındırdığı bilinen Chinese-166, Lee ve Vilmorin-23 yakın izogenik hatları arasında yapılan moleküler markör analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilgili gen bölgesiyle ilişkili olduğu bilinen NCBI tarafından önceden yayınlanmış SSR moleküler markörleri kullanılmıştır (Çizelge 2). Bu çalışmada bölgede uzun yıllardır ekimi gerçekleştirilen Tir buğdayının sahip olduğu uzun koleoptil avantajı yanı sıra önemli bir zarar etmeni olan sarı pasa karşı reaksiyonları belirlenmeye çalışılmıştır.

Çizelge 2. Bağlantı gruplarından seçilen ilgili gen bölgesiyle ilişkili 20 SSR primeri

Primer	Sekans	Lokus	Data Source
Wmc 149	F 5'ACAGACTTGGTTGGTGCCGAGC 3' R 5' ATGGGCGGGGTGTAGAGTTTG 3'	Xgwm6.1-4B	Roeder, Marion S.98.09.15
Wms 30	F5'ATCTTAGCATAGAAGGGAGTGGG 3' R 5' TTCTGCACCCTGGGTGAT 3'	Xgwm30.1-2D	Roeder, Marion S.98.09.15
Wms 108	F 5'ATTAATACCTGAGGGAGGTGC 3' R 5' GGTCTCAGGAGCAAGAACAC 3'	Xgwm108-3B	Roeder, Marion S.98.09.15
Wms 118	F 5' GATGTTGCCACTTGAGCATG 3' R 5' GATTAGTCAAATGGAACACCCC 3'	Xgwm118-5B	Korzun, Victor N.97.10
Wms 135	F 5' TGCAACATCGTTTGAAGG 3' R 5' AACTGTCAACCTGGCAATG 3'	Xgwm135-1A	Roeder, Marion S.98.09.15
Wms 149	F 5' CATTGTTTTCTGCCTCTAGCC 3' R 5' CTAGCATCGAACCTGAACAAG 3'	Xgwm149-4B	Roeder, Marion S.98.09.15
Wms 169	F 5' ACCACTGCAGAGAACACATACG 3' R 5' GTGCTCTGCTCTAAGTGTGGG 3'	Xgwm169-6A	Roeder, Marion S.98.09.15
Wms 198	F 5' TTGAACCGAAGGAGTACAG 3' R 5' TCAGTTTATTTGGGCATGTG 3'	Xgwm198-4A	Korzun, Victor N.97.10
Wms 304	F 5' AGGAAACAGAAATATCGCGG 3' R 5' AGGACTGTGGGGAATGAATG 3'	Xgwm304.2-2A	Roeder, Marion S.98.09.15
Wms 375	F 5' ATTGGCGACTCTAGCATATACG 3' R 5' GGGATGTCTGTTCCATCTTAGC 3'	Xgwm375-4B	Korzun, Victor N.97.10
Xgwm 11	F 5' GGATAGTCAGACAATTCTTGTG 3' R 5' GTGAATTGTGTCTTGTATGCTTCC 3'	Xgwm11-1B	Roeder, Marion S.98.09.15
Xgwm 18	F 5' TGGCGCCATGATTGCATTATCTC 3' R 5' GGTTGCTGAAGAACCCTATTTAGG3'	Xgwm18-1B	Roeder, Marion S.98.09.15
Xgwm 33	F 5' GGAGTCACACTTGTGTGCA3' R 5' CACTGCACACCTAACTACCTGC3'	Xgwm33-1A	Roeder, Marion S.98.09.15
Xbarc 137	F5'AGAGGACGCTGAGAAGTTAGAGAA3' R 5' GCGATCTTTGTAATGCATGGTGAAC3'	Xbarc137-1B	
Xgwm 148	F 5' GTGAGGCAGCAAGAGAGAAA3' R 5' CAAAGCTTGACTCAGACAAA3'	Xgwm148-2B	Roeder, Marion S.98.09.15
Xbarc 187	F5'GTGGTATTTCAGGTGGAGTTGTTTTA3' R 5' CCGAGGAGCAGTAAGGAAGG3'	Xbarc187-1B	
Xgwm 273	F 5' ATTGGACGGACAGATGCTTT3' R 5' AGCAGTGAGGAAGGGGATC3'	Xgwm273-1B	Roeder, Marion S.98.09.15
Xgwm 413	F 5' TGCTTGTCTAGATTGCTTGGG3' R 5' GATCGTCTCGTCCTTGGCA3'	Xgwm413-1B	Roeder, Marion S.98.09.15
Xgwm 264	F 5'GAGAAACATGCCGAACAACA3' R5'GCATGCATGAGAATAGGAACTG3'	Xgwm264-1BS	Roder et al., 1998
Xgwm 582	F 5' AAGCACTACGAAAATATGAC3' R 5' TCTTAAGGGGTGTTATCATA3'	Xgwm582-1B	Roeder, Marion S.98.09.15

SSR (Simple Sequence Repeat) analizi

SSR analizlerinde toplamda denenen 71 primer arasından farklı araştırmacılar (Ma ve ark. 2001, Deng ve ark. 2004, Anca ve ark. 2007, Wang ve ark. 2008) tarafından sarı pas hastalığına karşı dayanıklılık genlerini taşıdığı belirlenen bağlantı gruplarından seçilen ilgili gen bölgesiyle ilişkili 20 SSR primeri denenmiştir (Tablo 1). Yapılmış olan SSR analizleri için her tüpte toplam hacim 25 µl olacak şekilde; 50 ng genomik DNA, her bir dNTP'den 200 µM (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), her bir primerden 200 nM, 10xPCR tamponu (750 mM Tris-HCL, pH: 8.8, 200 mM (NH₄)₂SO₄, - MgCl₂ ve % 0.1 Tween20), 25mM MgCl₂, 1.5 unite Taq DNA polimeraz enziminden kullanılmıştır. PCR amplifikasyonu döngüleri; Sıcaklık ve döngü koşulları olarak, 94 °C'de 5 dk ön denatürasyon işleminden sonra, 35 döngü boyunca örnekler denatürasyon için 95 °C'de 1 dk, primerin DNA'ya yapışması için 50, 55, 58, 60 veya 63 °C 'de (Ro der ve ark. 1998)'nın her primer için belirledikleri yapışma sıcaklığında) 1 dk, ve uzama safhası için 72 °C'de 1 dk ve final uzama safhası için 72 °C'de 5 dakika tutulmuştur (Ma ve ark. 2001). PCR işleminden sonra amplifiye olan DNA'lar elektroforezde % 2'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Jel ve elektrot tampon çözeltisi için 10xTBE (216 gr Tris, 110 gr borik asit, 80 ml 0.5M EDTA pH 8.0 distile su ile 2 litreye tamamlanır) kullanılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri % 2 agaroz jelde 4.5 V/cm olacak şekilde elektroforezde 3-4 saat 10 X TBE tampon çözeltisinde koşuturup, jel 15 dk Ethidium Bromid çözeltisi ile boyandıktan sonra 15 dk saf suda yıkanarak, Quantum ST4 screening programı yardımı ile resimlerin görüntülenmesi sağlanmıştır. Standart markör olarak GeneRuler 100 bp'lik DNA ladder kullanılmıştır.

Veri analizi

Çoğaltılmış DNA Parçacıklarının Saptanması SSR primerlerinin PCR sonucunda popülasyonların oluşturduğu değişik parmak izlerine göre, bant varlığı (1) veya yokluğu (0) şeklinde belirlenmiştir (Nei and Li 1979). Primerlerin polimorfizm oranlarının saptanması; Primerlerin polimorfizm oranları, polimorfik bant sayılarının toplam bant sayısına bölünüp 100 ile çarpılması sonucu belirlenmiştir; Polimorfizm oranı (%) = (Polimorfik bant sayısı / Toplam bant sayısı) X 100 Primerlerin Polimorfizm Bilgi İçeriğinin (PBİ) Saptanması $PBİ = 1 - \sum Pi^2$ formülünden yararlanılarak saptanmıştır (Riek 2001). Bu yöntemle göre polimorfik bantlarda toplam var (1) ve yok (0) olan bantların sayıları belirlenip ve bu bantların her biri için frekans değerleri hesaplanmıştır (Pi: i bandının frekansı).

Tipler Arasındaki Genetik Uzaklığın Belirlenmesi

Genetik uzaklıklar, değişik benzerlik indeksi katsayıları (basit eşleştirme katsayısı veya Jaccard katsayısı) yardımıyla belirlenip ve çok boyutlu derecelendirme ve/veya dendrogramlar, UPGMA (Ağırlıklı Olmayan Aritmetik Ortalama Eş Grup Metodu) ve diğer hazır paket programları ile oluşturulmuştur (Labate 2000).

Yr26 Dayanıklılık Geninin Yer Aldığı Bağlantı Grubunun Oluşturulması

Bağlantı grubu SSR moleküler markör teknikleri kullanılarak oluşturulmaya çalışılmıştır. Yr26 geninin haritalanmasında öncelikli olarak Yr26 genine 1.9 cM yakınlıkta yer alan GWM11 ve GWM18 (Ma ve ark. 2001), YrH52 genine 2.2 cM mesafede yer alan GWM264 (Peng ve ark. 1999), Yr15, Yr24 ve Yr10 genlerine yaklaşık olarak 4.5 cM mesafede yer alan GWM33 (Ma ve ark. 2001), YrQz genine 5.6 cM mesafede yer alan GWM388 (Deng e ark. 2004) primerleri ve Yr26 genine 1.4 cM mesafe ile (Wang ve ark. 2008) SSR primerleri kullanılmıştır.

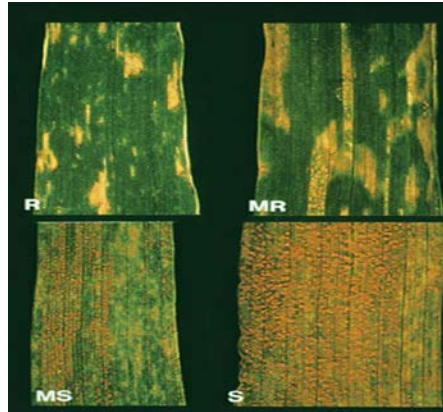
Bulgular ve Tartışma

Tir buğday genotiplerinin (Erciş 30/1, Erciş 60/1, Amik-M3, Adilcevaz, Merkez-Edremit) hastalık gözlemleri için gerçekleştirilen inokülasyonlar için Ankara Tarla Bitkileri Merkez Ararştırma Enstitüsü Müdürlüğünün Hastalık ve Zararlılara Dayanıklılık Departmanından temin edilmiş olan sarı pas (*Puccinia striiformis* f. sp. *Tritici*) patojen izolatlarının inokülasyonları Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü iklim odasında yapılmış olup herhangi bir hastalık reaksiyonu gözlenmemiştir. Ancak tekrarlamalı olarak Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü deneme arazilerinde patojen inokülasyonu yinelenmesi sonucu yapılan skorlamalarda beklenen sarı pas (*Puccinia striiformis* f. sp. *Tritici*) patojeninin genotipler üzerindeki yayılışı ve skorlama için yapılabilecek sayımlar açısından patojen ırklarının daha ziyade kahverengi pas (*Puccinia recondita tritici*) ırklarının gelişme gösterdiği gözlenmiştir. Modifiye edilmiş Cobb skalasına göre yapılan gözlemler sonucu patojeninin bitki üzerindeki reaksiyonu incelendiğinde sporların orta büyüklükte olduğu MS (Moderately Susceptible) ve sarı pas ırklarının gelişme göstermediği gözlenmiştir (Şekil 1).

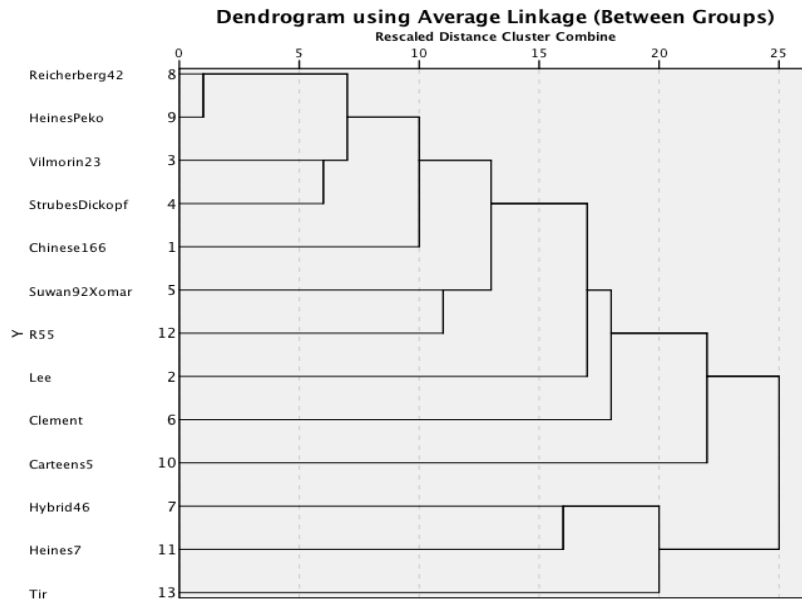


Şekil 1. Tir buğday genotiplerinde yapılan inokülasyonlar sonucu gözlemlenen patojen reaksiyonları.

R55 (6AL/6VS) translokasyon hattı ile yerel Tir buğday popülasyonlarından oluşturulmuş bulk (Erciş 30/1, Erciş 60/1, Amik-M3, Adilcevaz, Merkez-Edremit) ve yakın izogenik hatları arasındaki moleküler ilişkiyi incelemek amacıyla gerçekleştirilen moleküler analizlerde elde edilmiş değerlendirilebilir SSR bant desenleri üzerinden skorlanan binary veriler ile yapılan istatistik analizler ve dendrogram (filogenetik ağaç) görüntüleri Şekil 2. de verilmiştir. Kullanılan SSR primerleri toplam 212 polimorfik vermiş ve Ortalama polimorfik bant sayısı primer başına 5.2 olmak üzere maksimum polimorfik bant sayısı Xgwm 273 primerinden 49 olarak elde edilmiştir. Minimum polimorfik bant sayısı ise 13 ile Xgwm 11 primerinden elde edilmiştir. Polimorfizm yüzdesi % 74.3 ile en yüksek Xbarc 187 primerinden elde edilirken en düşük polimorfizm yüzdesi ise %24.6 ile Xgwm 413 primerinden elde edilmiştir. Değerlendirmeye alınmış primerlerin polimorfik bilgi içerikleri ise 0.37 ile 0.41 arasında değişiklik göstermiştir. R55 (6AL/6VS) translokasyon hattı, lokal Tir buğday popülasyonlarından oluşturulmuş bulk ve dayanıklılık geni barındırdığı bilinen 11 yakın izogenik hat ile gerçekleştirilmiş moleküler analizlerden elde edilen bantların oluşturduğu binary veri setine uygun olarak hazırlanmış dendrogram incelendiğinde (Şekil 3.) iki büyük ana grup altında toplanan genotipler içerisinde lokal Tir genotipinin iki izogenik hat ile birlikte ikinci grupta yer aldığı ve 1B-6B kromozom lokasyonunda Yr3b, Yr4b dayanıklılık genlerini barındıran Hybrid-46 ve 7B kromozomunda Yr-2+1 dayanıklılık genlerini barındırdığı bilinen Heines VII hattı ile yer aldığı görülmektedir. Yr26 dayanıklılık genini taşıdığı bilinen R55 (6AL/6VS) translokasyon hattı ise gözlemlenen bu iki majör grubun ilkinde diğer 9 tek gen hat ile bir arada yer almıştır. Lokal genotip Tir 2BL kromozomunda Yr-7 genine sahip Reicherberg 42 tek gen hattı ile en uzak genotipler olarak belirlenmiştir. Araştırmada kullanılan genotiplerinin birbirleriyle bant bazında benzerlik ve farklılık oranları Çizelge 3'te gösterilmiştir.



Şekil 2. Buğday yaprağında sarı pas enfeksiyon tipleri (Marsalis ve ark. 2006).



Şekil 3. SSR bant desenleri üzerinden oluşturulmuş 13 buğday genotipine ait dendrogram.

Çizelge 1. SRR bantları bakımından Tir ve NIL' lerin genetik benzerlik oranları

	Chinese166	Lee	Vilmorin23	StrubesDickopf	Suwan92Xomar	Clement	Hybrid46	Reicherberg42	HeinesPeko	Carteens5	Heines7	R55	Tir
Chinese 166	1.00												
Lee	0.67	1.00											
Vilmorin23	0.65	0.61	1.00										
StrubesDickopf	0.64	0.52	0.75	1.00									
Suwan92Xomar	0.50	0.53	0.71	0.68	1.00								
Clement	0.50	0.45	0.60	0.52	0.53	1.00							
Hybrid46	0.39	0.23	0.35	0.41	0.33	0.25	1.00						
Reicherberg42	0.67	0.48	0.70	0.76	0.55	0.48	0.32	1.00					
HeinesPeko	0.71	0.46	0.67	0.73	0.52	0.52	0.41	0.85	1.00				
Carteens5	0.37	0.27	0.44	0.56	0.44	0.33	0.35	0.52	0.56	1.00			
Heines7	0.38	0.19	0.40	0.41	0.39	0.22	0.55	0.36	0.41	0.33	1.00		
R55	0.60	0.40	0.55	0.62	0.65	0.41	0.31	0.65	0.62	0.40	0.50	1.00	
Tir	0.33	0.22	0.35	0.48	0.47	0.24	0.42	0.44	0.42	0.35	0.50	0.50	1.00

Sonuç

Dünyadaki tüm buğday yetiştirme bölgelerinde buğday yetiştirme programlarının en önemli hedeflerinden biri sarı pasa karşı toleranstır (Akfirat ve ark. 2010). Çeşitli coğrafi bölgelerden gelen buğday menşeli ürünler, yeni ve çeşitli dirençli germplazm geliştirmek için yeni pas direnç genlerinin potansiyel bir kaynağıdır (Sthapit et al., 2014). *Puccinia striiformis*'in neden olduğu sarı pas f. sp. Tritici kuşkusuz özellikle buğdayın, bilhassa Orta ve Batı Asya'da önemli miktarda yıllık verim kaybına neden olan en önemli mantar hastalığıdır. Dayanıklı dirençli çeşitlerin üretimi ve kullanımı en iyi kontrol yöntemidir. İki farklı lokasyonda ve iki tekrarlamalı olarak gerçekleştirilen pas inokülasyonlarında Cobb skalası göz önünde bulundurularak yapılan gözlemler sonucu sarı pas (*Puccinia striiformis* f. sp. Tritici) patojeninden kaynaklanan reaksiyonlar skorlanabilir düzeyde bir gelişme göstermemiş olmalarına rağmen kahverengi pas (*Puccinia recondita tritici*) ırklarının MS ölçekli (Moderately susceptible) orta duyarlı derecede reaksiyon gösterdiği gözlenmiştir. Bu durum genotiplerin verim kaybı bakımından risk taşıdıkları ve fungusit uygulamaları açısından patojen ırklarının gözlenmesinde fayda sağlayabileceği şeklinde yorumlanabilmektedir ancak bazı pas direnç genlerinin etkinliği, sıcaklık, ekin gelişme aşaması ve hatta konakçının azot durumundan etkilenir. Muhtemeldir ki iklim değişikliğinden dolayı konakçıda doğrudan ve dolaylı değişiklikler mevcut direnç genlerinin bazılarının etkililiğini etkileyebilir. Halen iklim değişikliğinin hastalık direncinin etkinliği üzerindeki olası etkileri bilinmemektedir ve hastalık direnci ıslahı uzun vadeli bir strateji olduğu için, önemli genlerden herhangi birinin iklim değişikliği nedeniyle daha az etkili olup olmayacağını belirlemek önemlidir (Sukumar ve ark. 2010). Yapılmış bu çalışmada gözlenmiş farklı patojen ırkı gelişimi sıcaklığın mevsim normalleri üzerinde seyretmesi ve patojen gelişimi için uygun nem ve sıcaklığın oluşmamış olmasından ve etkin genlerin değişen iklim koşulları ile interaksiyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmayla da gözlemlendiği üzere, iklim değişikliğinin patojen ırkları üzerine ve etkin direnç genlerinin aktivitesi üzerine olası etkilerinin araştırılması zorunluluğu ortaya çıkmıştır. Yr26'nın kökeni moleküler markör analizi ve direnç kalıtımı incelendiğinde *Triticum turgidum* L'den geldiğini göstermektedir ve sonuçlar, Yr26'nın Üç diğer 6AL/6VS translokasyon hatları, R43, R55, R64 ve R77 de taşındığını göstermiştir (Jizeng ve ark 2001). Hedef aleller ile yakından bağlantılı olan Moleküler belirteçler hastalık testlerine gerek duymadan ilgilenilen direnç geninin belirlenmesine yardımcı olabilecekleri için bitki ıslahı için faydalı bir araçtır. Yürütülen bu çalışmada R55 (6AL/6VS) translokasyon hattı ile lokal Tir genotipi arasında Yr26 gen durumu moleküler markörler kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca Tir genotipinin Yr1, Yr7, Yr3, Yr4, Yr9, Yr32, Yr6 ve Yr2 genleri bakımından da gözlemlenebilmesi amacıyla kullanılmış olan yakın izogenik hatlar sayesinde *Puccinia striiformis* direnç geni durumu her ırka özel hastalık testlerine gerek kalmadan moleküler düzeyde incelenmiştir. Yapılmış sarı pas inokülasyonları sonucu oluşan konakçı reaksiyonları haricinde moleküler analizler, bir çok ıslah programında önemli bir gen kaynağı olarak kullanılabilir bu lokal genotipin 7B, 1B ve 6B kromozom lokasyonlarında bulunan Yr2, Yr3 ve Yr4 direnç genlerini barındırabileceği sonucunu ortaya koymuştur.

Yr26'yı karakterize etmek için moleküler markörlerin kullanılması ve diğer moleküler belirteçler gen piramidini büyük ölçüde kolaylaştırmalı ve böylece dayanıklı sarı pas direnci elde etmek için ıslah çalışmalarını geliştirmelidir.

Teşekkür

2011-ZF-B044 no'lu proje ile finansal destek sağlanmış olan Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na, Pas inokülasyonlarının gerçekleştirilmesinde tanımış oldukları imkanlardan dolayı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsüne, *Puccinia striiformis* f. sp. Tritici patojen izolatlarının temin edildiği Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nün Hastalık ve Zararlılara Dayanıklılık Departmanına ve R55 (6AL/6VS) translokasyon hattı ile yakın izogenik hatların temin edildiği International Maize and Improvement Centre (CIMMYT) kuruluşuna teşekkür ederim.

Kaynaklar

- Akfirat SF, Aydın Y, Ertugrul F, Hasancebi S, Budak H, Akan K, Mert Z, Bolat N, Uncuoglu AA (2010). A microsatellite marker for yellow rust resistance in wheat. Cereal Res. Commun. 38: 203-210.
- Anca MV, Andersen SB, Banga D, Ardelean M, Torp AM (2007). Genetic mapping of wheat 2BL chromosome using SSR markers. Buletin USAMV-CN 64.
- Chen PD, Qi LL, Zhou B, Zhang SZ, Liu DJ (1995). Development and molecular cytogenetic analysis of wheat-Haynaldia villosa 6VS/6AL. Translocation Lines specifying resistance to powdery mildew. Theor Appl Genet. 91:1125-1128.

- Çetin L, Albustan S, Düşünceli F (1995). Hububat hastalıkları dayanıklılık ıslahı. Yıllık gelişme raporu. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü, Ankara.
- De Pace C, Montebone L, Delre V, Jan CC, Qualset CO, Scarascia GT (1988). Biochemical versatility of amphiploids derived from crossing *Dasypyrum villosum* candargy and wheat: Genetic control and phenotypical aspects. *Ther. Appl. Genet.* 76: 513-529.
- Deng ZY, Zhang XQ, Wang XP, Jing JK, Wang DW (2004). Identification and mapping of a stripe rust resistance gene from a common wheat line Qz180. *Acta Botanica Sinica.* 46 (2): 236-241.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissues, *Phytochemical Bulletin.* 19 (1): 11-15.
- Kınacı E (1992). Tahıl hastalıkları metodları kılavuzu, Milletler arası kışlık hububat araştırma merkezi müdürlüğü, Konya.
- Labate JA (2000). Software for population genetic analyses of molecular marker data. *Crop. Sci.* 40: 1521-1528.
- Ma J, Zhou R, Dong Y, Wang L, Wang X, Jia J (2001). Molecular mapping and detection of the yellow rust resistance gene Yr26 in wheat transferred from *Triticum turgidum* L. using microsatellite markers. *Euphytica.* 120: 219-226.
- Marsalis MA, Goldberg NP (2006). Leaf, stem and stripe rust diseases of wheat, New Mexico State University NMSU and the U.S. Department of Agriculture Cooperating. Guide. A-415. http://cahe.nmsu.edu/pubs/_a/A-415.pdf.
- Nei M, Li WH (1979). Mathematical model for studying variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76: 5269-5273.
- Peterson RF, Campbell AB, Hannah AE (1948). A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals. *Can. J. Res.* 26: 496-500.
- Riek JD, Calsyn E, Everaert I, Bockstaele EV, Loose MD (2001). AFLP based alternatives for the assessment of distinctness, uniformity and stability of sugar beet varieties. *Theo. Appl. Genet.* 103: 1254-1265.
- Roelfs AP, Singh RP, Sari EE (1992). Rust diseases of wheat: Concepts and method of disease management. Mexico, D.F.: CIMMYT. 81 pages.
- Röder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P, Ganal MV (1998). A microsatellite map of wheat. *Genetics Society of America.* 149: 2007-2023.
- Röder MS, Wendehake K, Korzun V, Bredemeijer G, Laborie D, Bertrand L, Isaac P, Rendel S, Jackson J, Cooke RJ, Vosman B, Ganal MW (2002). Construction and analysis of a microsatellite-based database of European wheat varieties. *Theor. Appl. Genet.* 106: 67-73.
- Sönmez F, Keskin S, Göçmen B (2002). A study on the determination of the reactions of lines of Tir wheat to yellow rust (*Puccinia striiformis f.sp. tritici*). *Crop Protection.* 21: 871-874.
- Sthapit J, Newcomb M, Bonman JM, Chen X, See DR (2014). Genetic diversity for stripe rust resistance in wheat landraces and identification of accessions with resistance to stem rust and stripe rust. *Crop Sci.* 54: 2131-2139.
- Sukumar C, Luck J, Hollaway G, Fitzgerald G, White N (2010). Rust-proofing wheat for a changing climate. BGRI 2010 Technical Workshop, 30-31- May 2010, St Petersburg, Russia.
- Wang C, Zhang Y, Han D, Kang Z, Li G, Cao A, Chen P (2008). SSR and STS markers for wheat stripe rust resistance gene Yr26. *Euphytica.* 159: 359-366.
- Yıldırım A, Jones SS, Murray TD, Line RF (2000). Evaluation of *Dasypyrum villosum* populations for resistance to cereal eyespot and stripe rust pathogens. *Plant Dis.* 84: 40-44.