

Fatma AYKUT TONK²
R.Refika AKÇALI³
M. Alp FURAN⁴
Süer YÜCE⁵

² Araş. Gör.Dr, Ege Üniversitesi Ziraat
Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, 35100
İzmir, fatma.aykut@ege.edu.tr

³ Uzm. Dr., Ege Üniversitesi Ziraat
Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, 35100
İzmir

⁴ Araş. Gör. Dr, Yüzüncü Yıl Üniv. Ziraat
Fak. Tarla Bitkileri Bölümü, 65080, Van

⁵ Prof. Dr., Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Tarla Bitkileri Bölümü, 35100 İzmir

Bazı Makarnalık Buğday Çeşitleri ile Yeni Geliştirilen Hatlarda Genetik İlişkilerin RAPD Markörleriyle İncelenmesi¹

Assessment of genetic relationships in some durum
wheat varieties and newly developed lines using RAPD
markers

¹ Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Komisyonu tarafından
desteklenen projenin (2003-ZRF-045) bir bölümüdür

Alınış (Received): 19.07.2008 Kabul tarihi (Accepted): 11.09.2008

Anahtar Sözcükler:

Makarnalık buğday, *Triticum durum*, genetik farklılık, RAPD

Key Words:

Durum wheat, *Triticum durum*,
genetic diversity, RAPD

ÖZET

Ege Bölgesi'nde verim yönünden ön plana çıkan dört makarnalık buğday çeşidi ile uzun yıllar yapılan denemeler sonucu ümitvar görülen CIMMYT kökenli üç introduksiyon hatında, moleküler markör yöntemlerinden RAPD metodu ile söz konusu genotipler arasında genetik olarak benzerliklerin ve farklılıkların incelenmesi bu çalışmanın amacını oluşturmuştur.

Yapılan DNA analizleri sonucunda, çalışmada incelenen çeşit ve hatların genetik olarak birbirine yakın olduğu ve bunlara ait ortalama genetik benzerlik oranının 0.86 olduğu saptanmıştır. Ayrıca Ege-88 ile Yaveros-79 çeşitlerinin birbirlerine en yakın genotipler olduğu anlaşılmıştır.

ABSTRACT

The main purposes of this project were to investigate genetic similarities and diversities among four durum wheat varieties which are high-yielding genotypes in Ege Region and three introduction lines from CIMMYT, tested for long years and detected as superior, using RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) method a molecular marker technique.

Results from the DNA analysis showed that investigated varieties and lines in this project were very closed genotypes as genetic and average genetic similarity ratio of the genotypes was 0,86. Also, it was concluded that Ege-88 and Yaveros-79 varieties were the closest genotypes.

GİRİŞ

Genetik gelişimin temeli genetik çeşitliliğdir. Germplasm çeşitliliğinin bilinmesi bitkilerin geliştirilmesinde önemli bir etkiye sahiptir. Modern ıslahtan dolayı buğdayda genetik çeşitlilik artan bir şekilde daralmaktadır. Daralan genetik çeşitlilik ıslahta hastalık gibi biyotik stres veya kuraklık, tuza tolerans gibi abiyotik stres koşullarına dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesinde problem yaratır (Huang ve ark. 2002).

Herhangi bir çeşit geliştirme programında genetik çeşitlilik önceden belirlenmesi gereken bir konudur. Hibrit ıslahından sonra buğday ıslah programlarında da germplasm çeşitliliği çok önem kazanmıştır. Buğdayda genetik çeşitliliği belirlemek için fenotipik markörler, izoenzim/depo proteinleri ve soy kütüğü yöntemi gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır. Fakat fenotipik ve protein markörleri sınırlı sayıdadır ve çevreden etkilenirler. Soy kütüğü yöntemi ise çeşitlerin detaylı bir şekilde pedigrı kayıtlarını gerektirmektedir ve varsayımlara dayanır. DNA seviyesinde polimorfizmi belirlemek için geliştirilen teknikler ile bitki genomlarının moleküler analizleri yapılmaya başlanmış ve bu amaçla gün geçtikçe çok farklı yöntemler geliştirilmiştir (Sud ve ark. 2005). Günümüzde DNA markörlerinden birçoğu buğdayda genetik çeşitliliği belirlemek için kullanılmaktadır; örneğin random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Sawalha ve ark. 2008), restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Corbellini ve ark. 2002), simple sequence repeat (SSR) (Eujayl ve ark. 2001), amplified fragment length polymorphism (AFLP) (İncirli ve Akaya, 2001) ve selective amplification of microsatellite polymorphic loci (SAMPL) (Altıntaş ve ark. 2008).

Bunlardan PCR (Polymerase Chain Reaction)'ye dayalı yöntemlerden biri olan RAPD metodunda (Williams ve ark. 1990) genomun farklı bölgeleri genellikle 10 baz uzunluğundaki tek primerler ile çoğaltılır. PCR boyunca farklı büyüklükteki fragment grupları yeteri kadar çoğaltılır ve DNA bant şablonlarında molekül ağırlıklarından dolayı varyasyon oluştururlar. Polimorfizmin diğer bir nedeni, PCR süresince genomdaki sekans varyasyonunun primerin bağlanma bölgelerini değiştirmesidir (Jones ve ark. 1997). RAPD metodu süre ve maliyet etkinliği bakımından diğer PCR'ye dayalı yöntemler gibi haritalama ve genetik karakterizasyon çalışmalarında çok tercih edilen bir yöntemdir. Ayrıca genetik çeşitlilik çalışmalarında da buğdayın da içinde bulunduğu birçok bitki türünde yoğunlukla kullanılmaktadır. Bilgin ve Korkut (2005) yirmi ekmeçlik buğday genotipinde genetik uzaklığı belirlemek için 10 RAPD primeri kullanmışlar ve bunlardan 5 adedini değerlendirmeye almışlardır. Akar ve Özgen (2007) Türkiye'nin farklı bölgelerinden topladığı

makarnalık buğday köy çeşitlerinde genetik farklılığı RAPD metodu ile araştırmışlardır. Aliyev ve ark. (2007) çoğunluğu Azerbaycan orijinli diploid ve tetraploid buğday türlerinde genetik farklılığı RAPD yöntemi ile inceleyerek genetik ve fenotipik benzerlikler arasında ilişkileri ortaya koymuşlardır.

Bölümümüz makarnalık buğday ıslahında Uluslararası Buğday ve Mısır Araştırma Merkezi (CIMMYT; Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo) ile ortaklaşa çalışmakta ve bu kurumlardan ıslah materyali sağlamaktadır. Bölümümüz makarnalık buğday ıslah çalışmalarında ve çeşit verim denemelerinde uzun yıllardır standart çeşit olarak Ege Bölgesi'nde verim yönünden ön plana çıkan Ege-88, Yavaros-79, Altar-84 ve Salihli-92 (Demir ve ark. 1997) çeşitlerini kullanmaktadır. Bu çalışmanın amacı CIMMYT ıslah materyalinden geliştirilmiş üstün bazı hatlar ile Ege-88, Yavaros-79, Altar-84 ve Salihli-92 çeşitlerinde genetik benzerlik ve farklılıkların araştırılmasıdır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Proje kapsamında Ege Bölgesi'nde ekimi yapılan (Ege-88, Yavaros-79, Altar-84, Salihli-92) makarnalık buğday çeşitleri ile CIMMYT introduksiyon materyalinden geliştirilmiş hatlar (41, 47 ve 50 No'lu hatlar) materyal olarak kullanılmıştır (Çizelge 1).

DNA analizleri Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'ne ait Uygulamalı Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

DNA'ların elde edilmesinde Doyle ve Doyle (1987) metoduna göre CTAB mini izolasyon yöntemi izolasyon yöntemi kullanılmıştır.

PCR reaksiyonunda her örnekten eşit miktarda DNA kullanılması gerekmektedir. Bu nedenle izole edilen çift iplikli DNA miktarının tayini spektrofotometrede (Pye unicam SP6-500 UV) yapılmış ve OD sonuçlarından hesaplanan DNA miktarlarına göre PCR analizi için μ l'de 5 ng olacak şekilde TE (Tris-EDTA) çözeltisi ile seyreltilmiştir.

PCR işlemi için, her tüpte toplam hacim 15 μ l olacak şekilde; 25 ng genomik DNA, her bir dNTP'den 100 μ M (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 15 ng primer (Operon Teknolojisi), 1xTaq DNA

Çizelge 1. Çalışma materyalini oluşturan çeşit ve hatlar.

Sıra No	Çeşit, Hatlar ve Pedigrileri	Orijinleri
1	EGE-88 (Jori/Anhinga//Flamingo (Bittern "S"))	E.T.A.E.
2	YAVAROS-79 (JO"S"/AA"S"/FG"S=BIT"S")	CIMMYT
3	ALTAR-84 (RUFF"S"/FG"/MEXI75/3/SHWA"S=GA"S")	CIMMYT
4	SALİHLİ-92 (SHWA//21563/Anhinga/3/Ege 88)	E.T.A.E.
5	PLATA1/SNK//PLATA 9-CD 97899-H-29 (Hat-41)	CIMMYT
6	SUCKUK 07 CD 96492-A-1M-0309 (Hat-47)	CIMMYT
7	SN TURK M183-84375/Nİ3 RIS 5//TANTLO (Hat-50)	CIMMYT

E.T.A.E.: Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü
CIMMYT: Uluslararası Buğday ve Mısır Araştırma Merkezi

polimeraz tamponu (100 mM Tris-HCL, pH: 8.3, 500 mM KCL, 15 mM MgCl₂ ve % 0.01 jelatin), 1 ünite Taq DNA polimeraz enziminin (Sigma) oluşmaktadır.

PCR işlemi için 10 baz uzunluğundaki Operon Teknolojisine ait 6 farklı primer kullanılmıştır. Kullanılan primerler ve baz dizilişleri Çizelge 2'de verilmiştir.

DNA'nın çoğaltımı için PCR işlemi, thermocycler (Appligene Oncor, Crocodile III) cihazında, 94°C'de 30 saniyede 1 döngü, 94°C'de 25 saniye, 35 °C'de 45 saniye, 72 °C'de 1 dakika 35 döngü ve son olarak 72 °C'de 5 dakikadan oluşan PCR programına göre gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2. PCR reaksiyonunda kullanılan primerler ve baz dizilişleri.

Primer İsmi	Baz Dizilişi
OPA-10	5'-GTGATCGCAG-3'
OPD-18	5'-GAGAGCCAAC-3'
OPE-01	5'-CCCAAGGTCC-3'
OPE-05	5'-TCAGGGAGGT-3'
OPG-03	5'-GAGCCCTCCA-3'
OPG-08	5'-TCACGTCCAC-3'

PCR işleminden sonra amplifiye olan DNA'lar elektroforezde % 1.5'lük agaroz jelde yürütülmüştür. Jel ve elektrot tampon çözeltisi için 50xTAE (242 g Tris, 57.1 ml asetik asit, 37.2 g EDTA pH 8.5 distile su ile 1litreye tamamlanır) kullanılmıştır. Elektroforez işlemi Fisher Biotech, FB-LSU-1 cihazında gerçekleştirilmiştir. Standart markör olarak 27000 bp'lik λ DNA Hind III /Eco R1 kullanılmıştır.

Elektroforez işleminden sonra DNA'nın görünür hale getirilip değerlendirilebilmesi için ethidium bromid ile boyanmıştır. Jel 2 µg/ml ethidium bromid içeren saf suda 20 dakika çalkalanarak boyanmış ve daha sonra fazla boyayı uzaklaştırmak için 15 dakika saf suda yıkanmıştır. Bantların değerlendirilebilmesi için jeller boyama işleminden sonra UV ışık altında incelenmiş fotoğraf makinası ile fotoğrafları çekilmiştir.

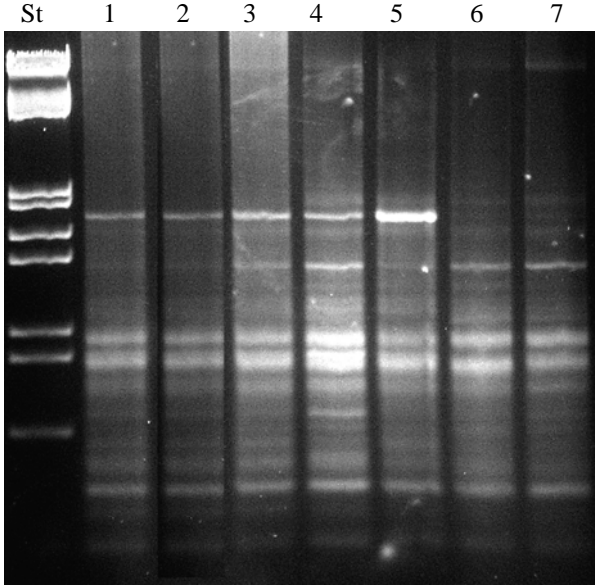
Genotipler arasındaki genetik benzerlik ve genetik uzaklık değerleri, RAPD bantlarının varlığında 1 yokluğunda 0 olacak şekilde hazırlanmış olan veri matrisinden yararlanarak Nei ve Li (1979) tarafından geliştirilen benzerlik oranı formülüne göre hesaplanmış ve genetik uzaklık matrisi elde edilmiştir. Ayrıca NTSYS-version 2.0 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Rohlf, 1998) istatistik paket programında UPGMA (Unweighted pair-group method arithmetic average) gruplandırmasına göre genotiplere ait dendrogram elde edilmiştir. Benzerlik katsayısı "Jaccard"ın metoduna göre hesaplanmıştır.

ARAŞTIRMA BULGULARI

RAPD analizi sonucunda değerlendirmeye alınan 6 primer (OPA-10, OPD-18, OPE-01, OPE-05, OPG-03 ve OPG-08) toplam 46 adet bant vermiştir. Elde edilen bantların 21 adedinin polimorfik, 25 adedinin monomorfik bantlar olduğu gözlenmiştir. Ortalamalar incelendiğinde; ortalama polimorfik bant sayısı 3.5, ortalama monomorfik bant sayısı 4.2 ve birey başına düşen RAPD bant sayısı 6.6 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3. Genotiplerin genetik uzaklık matrisi.

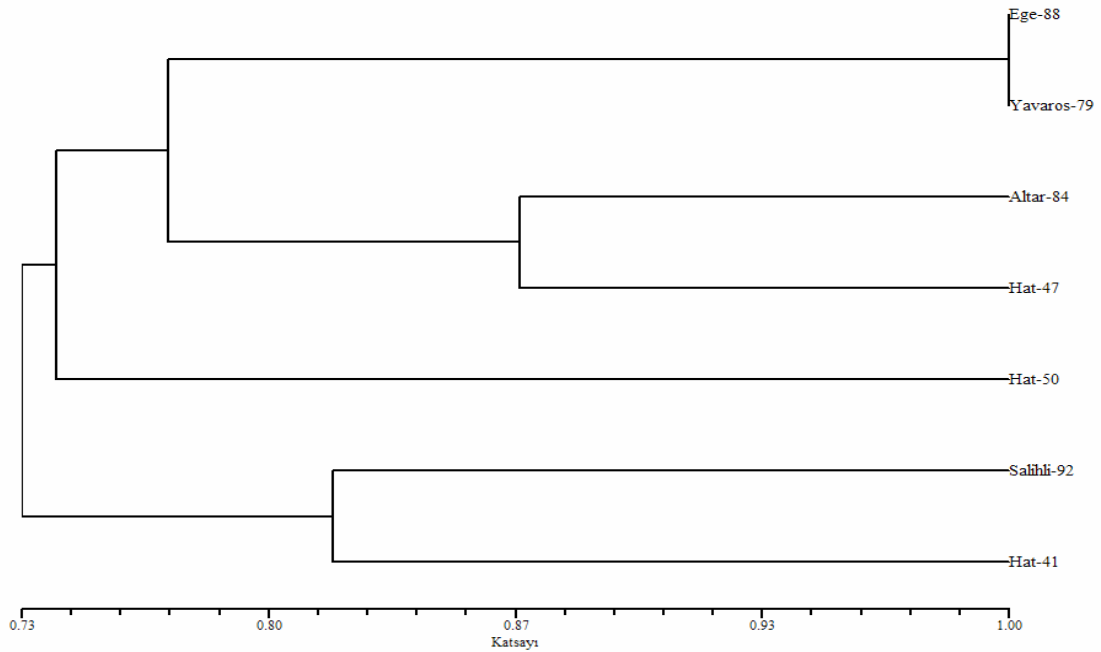
	Yavarnos-79	Altar-84	Salihli-92	Hat-41	Hat-47	Hat-50
Ege-88	0.00	0.10	0.15	0.18	0.15	0.16
Yavarnos-79		0.10	0.15	0.18	0.15	0.16
Altar-84			0.13	0.13	0.07	0.16
Salihli-92				0.10	0.14	0.24
Hat-41					0.14	0.15
Hat-47						0.12



Şekil 1. OPG-03 primerinin RAPD sonuçları. St: Stan-dart DNA, 1: Ege-88, 2: Yavarnos-79, 3: Altar-84, 4: Salihli-92, 5: Hat-41, 6: Hat-44, 7: Hat-50.

Primerler değerlendirmeye alındığında; en fazla bant veren primerler OPD-18, OPE-01 ve OPE-05, en az bant veren primer ise OPG-08 primeri olarak gözlenmiştir. En fazla polimorfik bant veren primerler OPD-18, OPE-01 ve OPE-05 en fazla monomorfik bant veren primer OPA-10 olarak belirlenmiştir. OPG-03 primerine ait RAPD bant deseni Şekil 1'de verilmiştir.

Araştırmada kullanılan makarnalık buğday genotiplerinin birbirleriyle olan genetik uzaklık matrisi Çizelge 3'de gösterilmiştir. Çizelge incelendiği zaman genotiplere ait genetik uzaklık değerlerinin 0.00-0.24 arasında değiştiği görülmektedir. Genotiplere ait ortalama genetik uzaklık değeri 0.14 (toplam polimorfizm/karşılaştırma sayısı) olarak saptanmıştır. Genotiplere ait genetik benzerlik oranları 0.76-1.00 arasında varyasyon göstermiştir. Genotiplere ait ortalama benzerlik oranı



Şekil 2. Genotiplere ait UPGMA dendrogramı.

0.86 (toplam monomorfizm/karşılaştırma sayısı) olarak saptanmıştır. Ayrıca Ege-88 ile Yavaros-79 ve Altar-84 ile Hat-47 genotiplerinin birbirleriyle çok yakın genotipler olduğu anlaşılmaktadır. Bu genotipler arasındaki yakın ilişki elde edilen dendrogramda da görülmektedir (Şekil 2).

Jaccard'ın benzerlik indeks katsayısına göre oluşturulan makarnalık buğday genotiplerine ait dendrogram Şekil 2'de verilmiştir. Dendrograma göre makarnalık buğday çeşit ve hatları iki ana grup altında toplanmışlardır. Birinci grupta Salihli-92 çeşidi ile Hat-41 yer almıştır. İkinci grup iki alt gruptan oluşmuştur. Birinci alt grupta Ege-88, Yavaros-79, Altar-84 ve Hat-47 yer alırken ikinci alt grubu Hat-50 oluşturmuştur.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada bölümümüz makarnalık buğday ıslah çalışmalarında standart çeşit olarak kullanılan ve Ege Bölgesi'nde verim yönünden ön plana çıkan bazı makarnalık buğday çeşitleri ile yine bölümümüzün ortaklaşa çalıştığı CIMMYT kuruluşundan temin ettiği ve uzun yıllar sonucu ümitvar olarak seçtiği bazı makarnalık buğday hatlarında RAPD markörleri kullanılarak genetik uzaklık araştırılmıştır.

İncelenen makarnalık buğday genotiplerine ait genetik uzaklık değerlerinin 0.00-0.24 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Bu değerler bu genotipler arasında genetik varyabilitenin düşük olduğunu göstermektedir. Araştırılan genotipler CIMMYT ve Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü (ETAE) orijinli genotiplerdir. ETAE buğday ıslah çalışmalarında CIMMYT ile de ortaklaşa çalışmakta ve geliştirdiği çeşitlerde CIMMYT ıslah materyalini de kullanmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada incelenen genotipler arasındaki genetik varyabilitenin düşük olmasının nedeni ortak CIMMYT genitörleri olabilir. İncirli ve Akkaya (2001) yazlık ve kışlık Türk makarnalık buğday çeşitlerinde genetik

uzaklığı AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) markörleriyle araştırmışlar ve inceledikleri bu makarnalık buğday çeşitlerinin genetik olarak benzer olduklarını belirtmişlerdir. Altıntaş ve ark. (2008) Türkiye'de yetiştirilen makarnalık buğday çeşitlerinin çoğunluğunun CIMMYT germplasmını taşıdığını ve genetik olarak dar bir çeşitliliğe sahip olduklarını saptamışlardır. Ancak Türk makarnalık buğday çeşitleri ile bazı köy popülasyonları arasındaki genetik çeşitliliği araştıran başka bir çalışmada, genotipler arasındaki genetik uzaklık değerleri 0.74 ile 0.99 arasında değişmiştir (Akar ve Özgen, 2007).

Elde edilen gerek genetik uzaklık matrisi gerekse UPGMA dendrogramına göre Ege-88 ile Yavaros-79 çeşidi genetik olarak birbirine en yakın çeşitler olarak belirlenmiştir. Ege-88 çeşidi ETAE, Yavaros-79 çeşidi ise CIMMYT tarafından geliştirilmiş çeşitlerdir. Ancak bu çeşitlerin pedigrilerine bakıldığı zaman ortak bir ataya (Anhinga;AA) sahip oldukları görülmektedir. Elde edilen genetik yakınlığın nedeni bu ortak atadan kaynaklanabilir. İncirli ve Akkaya (2001) Ege-88 ile Salihli-92 çeşitleri arasındaki yakın genetik ilişkiyi 'Anhinga' ortak atasından kaynaklanabileceğini ve ayrıca Ege-88'in Salihli-92 çeşidinin diğer atası olduğunu vurgulamışlardır. Bu nedenle Ege-88 ve Yavaros-79 çeşitleri aynı ıslah programında genitör olarak kullanılmak istenirse bu sonuç dikkate alınmalıdır.

Araştırmada incelenen makarnalık buğday genotiplerinde RAPD tekniği başarılı bir şekilde uygulanmış ve elde edilen sonuçlarla bu genotipler arasındaki genetik varyasyon ortaya konmuştur. Ayrıca bu çalışma ile RAPD tekniğinin maliyetinin düşük, hızlı, az bitki örneği ile yapılabildiği bir kez daha anlaşılmış ve bundan sonraki genetik çeşitlilik çalışmalarında bu yöntemin yaygın bir şekilde kullanılabilmesi gösterilmiştir. Ancak bu tür genetik varyasyon çalışmalarında daha çok sayıda primer kullanılması araştırmaların başarısını arttıracaktır.

KAYNAKLAR

- Akar, T. and M. Ozgen. 2007. Genetic diversity in Turkish durum wheat landraces. *Wheat Production in Stressed Environments*, 753-760.
- Aliyev, R. T., M. A. Abbasov and A. C. Mammadov. 2007. Genetic identification of diploid and tetraploid wheat species with rapd markers. *Turk. J. Biol.*, 31: 173-180.

- Altıntaş, S., F. Toklu, S. Kafkas, B. Kilian, A. Brandolini and H. Ozkan. 2008. Estimating Genetic diversity in durum and bread wheat cultivars from Turkey using AFLP and SAMPL markers. *Plant Breeding*, 127: 9-14.
- Bilgin, O. ve K. Z. Korkut. 2005. Bazı ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşit ve hatlarının genetik uzaklıklarının belirlenmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2 (3): 245-252.
- Corbellini, M., M. Perenzin, M. Accerbi, P. Vaccino and B. Borghi. 2002. Genetic diversity in bread wheat, as revealed by coefficient of parentage and molecular markers, and its relationship to hybrid performance. *Euphytica*, 123: 273-285.
- Demir, İ., S. Yüce, W. Friedt, F. Ordon and C. Konak. 1997. Zuchtfortschritte und moderne Tendenzen in der Weizenzüchtung, s.101-105. *Deutsch-Türkische Agrarforschung 5. Symposium (29. September- 4. Oktober 1997, Antalya)*, Verlag Ulrich E. Grauer, Stuttgart, 1998.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochemical Bulletin*, 19(1): 11-15.
- Eujayl, I., M. Sorrells, M. Baum, P. Wolters and W. Powell. 2001. Assessment of genotypic variation among cultivated durum wheat based on EST-SSRS and genomic SSRS. *Euphytica*, 119: 39-43.
- Huang, X. Q., A. Börner, M. S. Röder and M. W. Ganal. 2002. Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.*, 105: 699-707.
- İncirli, A. and M. S. Akaya. 2001. Assessment of genetic relationships in durum wheat cultivars using AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 48: 233-238.
- Jones, N., H. Ougham and H. Thomas. 1997. Markers and mapping: we are all geneticists now. *New Phytol.*, 137: 165-177.
- Nei, M. and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 76: 5269-5273.
- Rohlf, F. J. 1998. *NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.0, User's Guide*. New York: Exeter Software.
- Sawalha, K., H. Eideh, S. Laham, H. Hasasneh and B. Mezeid. 2008. Genetic diversity studies on wheat landraces in palestine using RAPD markers in comparison to phenotypic classification. *Journal of Applied Biological Sciences*, 2 (1): 29-34.
- Sud, S., N. S. Bains and G. S. Nanda. 2005. Genetic relationships among wheat genotypes, as revealed by microsatellite markers and pedigree analysis. *J. Appl. Genet.*, 46(4): 375-379.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18(22): 6531-6535.