

28269

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

ARPADA ÇEŞİTLİLİĞİN MOLEKÜLER DÜZEYDE TANIMLANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
(Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Programı)

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

A.FİHİZ GÜREL

Danışman: Doç.Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

Ocak - 1993

TEŐEKKÜR

Bu çalışmanın tamamı TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü laboratuvarlarında ve Enstitü olanakları ile gerçekleŐmiştir. Bu olanağı sağlayan Sayın Prof.Dr.Engin BERMEK'in Őahsında tüm kurum çalıőanlarına gösterdikleri ilgi ve yardımlar için teŐekkür ederim.

Tez çalıőmam sırasında bilgi ve deneyimleri ile bana öncülük eden tez danıŐmanım Sayın Doç.Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI'ya, çalıőmalarımın her aşamasında ilgi, destek ve yardımlarını gördüğüm Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve elemanlarına teŐekkürü bir borç bilirim.

Çalışmada kullanılan yabancı arpa hatlarını Osman Tosun Gen Bankası koleksiyonlarından bizlere ulaőtıran Sayın Prof.Dr. Didar ESER'e, tezimin yazımı sırasında ilgi ve desteğini gördüğüm Dr.Kemal KAZAN'a ve laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan teknisyen Rahmi BÜYÜKKESKİN'e teŐekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
1. GİRİŞ	1
2. GEREÇ ve YÖNTEM	5
2.1. BİTKİ MATERYALİ	5
2.1.1 Bitkilerin Yetiştirilmesi	5
2.1.2 Genomik DNA'nın İzolasyonu	7
2.2 POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR) İLE GENOM PARMAK İZİNİN ÇIKARILMASI	8
2.2.1 Primerler	9
2.2.2 Enzim	9
2.2.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu için Örneklerin Hazırlanması	9
2.2.4 Termal - Saykır'ın Programlanması	10
2.2.5 PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi için Hazırlanması	11
2.2.6 Agaroz Jel Elektroforezi	11
2.3 POLİMORFİZM ORANININ HESAPLANMASI	12

3. BULGULAR	13
3.1 PCR KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU	13
3.3.1 Çeşitli MgCl₂ Konsantrasyonlarının Çoğaltım (Amplifikasyon) Üzerine Etkileri	13
3.2 YABANI ARPA HATLARININ GENOMİK PARMAK İZLERİNİN ÇIKARILMASI	16
3.2.1 Arpa Hatları Arasındaki Polimorfizmin İncelenmesi	18
4. TARTIŞMA	22
5. ÖZET	26
6. SUMMARY	27
7. KAYNAKLAR	28

1. GİRİŞ

Arpa (*Hordeum vulgare* L.); buğday, pirinç ve mısırdan sonra tarımsal bakımdan dördüncü sırada yer alan önemli bir tahıl bitkisi olmasının yanısıra biyokimyacılar, fizyologlar, genetikçiler ve moleküler biyologlar için önemli bir model organizmadır (Shewry P.R., 1992). Ülkemizde Fırat ve Dicle nehirleri arasındaki 20000 km²'lik alan, arpa bitkisinin dünyadaki en önemli gen merkezlerinden biridir (IBPGR, 1989).

Hızlı nüfus artışı, ormanların tahribatı ve toprak erozyonu, bitki türlerinin zengin olduğu bölgeleri ve dolayısıyla genetik çeşitliliği ciddi boyutlarda yok etmektedir. Bunun sonucu olarak, doğadan toplanan bitki materyalinin yeni biyoteknolojik yöntemlerle uzun süreli saklanması fikri doğmuş ve bu amaçla dünyanın çeşitli merkezlerinde gen bankaları kurulmuştur (Tosser W.E., 1991).

Doğadaki yabani varyetelerin toplanması ve moleküler düzeyde tanımlanması, ekonomik değeri olan varyetelere yeni ve üstün nitelikler kazandırmak açısından önem taşır. Bu varyetelerin gen verici olarak kullanımı ve moleküler yöntemler ile istenilen tiplerin seçimi klasik ıslah yöntemlerindeki güçlüklerin aşılmasına olanak vermektedir (Bothmer R. ve ark. 1991).

Günümüzde kültür bitkilerinin detaylı genetik haritalarının yapılmasında, hatlar arasındaki polimorfizmin deoksiribonükleik asit (DNA) düzeyinde saptanmasında ve gen bankalarında saklanan materyalin kesin kimlik tayininde moleküler markır tekniklerinden

yararlanılmaktadır (Andersen W.R. ve Fairbanks D.J., 1990). Bu teknikler, bitkilerin genetik potansiyellerinin amaca uygun biçimde yönlendirilmesi açısından önem taşımaktadır ve gerek araştırma ve gerekse uygulamada yaygın biçimde kullanılmaktadır (Halward T. ve ark., 1992).

Son yıllara kadar, bitki enzimlerinin farklı elektroforetik özelliklerine dayalı, biyokimyasal markır teknikleri (izoenzimler vb. gibi) kullanılmıştır (Smith J.S.C., 1988; Doebley J.F. ve ark., 1985; Wilson H.D, 1988). Hızlı ve maliyeti düşük olmasına rağmen bu teknikler, sınırlı sayıda polimorfizmi tespit edebildiğinden yerini DNA markırlarına bırakmaktadır (Bernatsky R. ve Tanksley S.D., 1989).

Genetik çeşitliliğin saptanmasında, DNA markırlarının kullanımı; ilk kez 1980'li yıllarda Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) (Botstein D. ve ark., 1980) tekniğinin geliştirilmesi ile ortaya çıkmıştır.

Bu teknik, bakteriyel restriksiyon endonukleazlarının kesim bölgelerinin oluştuğu veya ortadan kalktığı DNA dizilerindeki varyasyonu kullanmaktadır (Laurie D.A. ve ark., 1992). RFLP markırlarının eldesi tek veya düşük kopya sayısına sahip DNA dizilerinin tayinini sağlayacak, radyoaktif işaretli propların kullanımına bağlıdır (Tanksley S.D. ve ark., 1989). Bununla birlikte, RFLP markırlarının kullanımı pahalı, zaman alıcı ve teknik açıdan zordur (Goodwin P.H. ve Annis S.L., 1991).

DNA markır tekniklerinin gelişiminde bir başka uygulama; Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) (Mullis K.B. ve Faloona F.A., 1987; Saiki R.K. ve ark., 1988; Ochman H. ve ark., 1988; Erlich H.A. ve ark., 1991) tekniğinin genetik çeşitliliğin saptanmasında kullanılmasıdır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu tekniği, nükleik asit dizisi bilinen DNA bölgelerinin, DNA polimeraz enzimi aracılığı ile milyonlarca kez çoğaltımı esasına dayanır. Bu yaklaşımın en önemli özelliği, pikogram düzeyindeki miktarların, başlangıç materyali olarak kullanılabilmesidir (Graul A.I., 1989). Bu teknik, bir seri tekrarlanan replikasyon döngülerini içermektedir. Her bir döngü farklı sıcaklık derecelerinde gerçekleşen üç aşamadan meydana gelir:

- I. DNA'nın denatürasyonu
- II. Primerlerin DNA'ya bağlanması
- III. Yeni DNA zincirlerinin sentezi.

Sentezlenen DNA bölgesi, teorik olarak, herbir döngü sonunda 2 kat artarak 30 döngü sonunda yaklaşık 2^{28} kat (270 milyon kez) oğaltılmış olmaktadır.

1990 yılında iki ayrı araştırıcı grubu (Welsh J. ve McClelland M., 1990; Williams J.G.K. ve ark., 1990) zgl nükleotid dizi bilgisine gereksinim olmadan polimorfizmin, PCR yöntemi ile tek bir primer kullanılarak ortaya konabileceğini gösterdiler. Literatürde "Random Amplified Polimorphic DNA" (RAPD) olarak tanımlanan bu yöntemde, çok geniş bir çeşitlilik kısa zamanda ve kolaylıkla saptanabilmektedir. Bu teknikte, Guanin, Sitozin (GC) içeriği % 40 veya daha fazla olan rastgele nükleotit dizisine sahip kısa primerler, genomik DNA'nın çeşitli bölgelerinin çoğaltımında kullanılır. Sonuçta oluşan fragmentlerin sayı ve büyüklüğü, primerin nükleotit dizisine ve kalıp DNA'da bu dizinin varlığına bağlı olarak genoma özgü bir "parmak izi" oluştururlar (Klein-Lankhorst R.M. ve ark., 1991).

Bu yöntemde, hatlar arasında polimorfizmin ortaya çıkmasında, primerlerin genomik DNA'ya bağlandığı bölgelerdeki nokta

mutasyonları ile bu bölgeler arasındaki insersiyon ve delesyon gibi mekanizmalar rol oynamaktadır (Caetano - Anollés G. ve ark., 1991).

Bu çalışmada, ülkemizdeki yabancı arpa hatlarının toplanarak, gerek tohum gerekse genetik materyal olarak uzun süreli saklanması ve genetik çeşitlilikle ilgili çalışmaların yapılması amaçlanmıştır.

Bunun için, Türkiye arpa koleksiyonunu temsil eden 250 arpa hattının DNA'ları izole edilerek, bunlardan değişik yöreleri temsil eden 19'unun, RAPD (Welsh J.ve McClelland M., 1990; Williams J.G.K. ve ark., 1990) tekniği kullanılarak genetik parmak izi çıkarılmış ve aralarındaki çeşitlilik oransal olarak ortaya konmuştur.

Bu çalışma, günümüze kadar sadece sınırlı sayıda morfolojik karakter açısından sınıflandırılmış olan arpa materyalinin genetik parmak izi yöntemleri ile tanımlanması açısından önem taşır. Böyle bir çalışmanın, ileride bu arpa hatları üzerinde yapılabilecek moleküler genetik araştırmalar için başlangıç oluşturabileceği düşünülmektedir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1 BİTKİ MATERYALİ:

Bu çalışmada kullanılan yurdumuz orijinli yabani arpa hatlarına ait tohumlar Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Osman Tosun Gen Bankası'ndan sağlandı (Tablo 1). Bu materyalin yanısıra 20 yılı aşkın süredir İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde mutasyon ıslahı ve doku kültürü çalışmalarında model organizma olarak kullanılan, *Hordeum vulgare* L. cv. Zafer - 160 arpa çeşidi Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR)'unun optimizasyonunda ve çeşitliliğin moleküler düzeyde tanımlanmasında kontrol materyali olarak seçildi. Bu varyetelere ait tohumlardan yetiştirilen bitkilerin yapraklarından elde edilen genomik deoksiribonükleik asit (DNA), PCR ile çoğaltıldıktan sonra hatlar arasındaki genetik farklılığın moleküler düzeyde karşılaştırmalı olarak tanımlanmasında kullanıldı.

2.1.1 Bitkilerin Yetiştirilmesi

Bitkiler TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gebze / Kocaeli seralarında, her varyeteden 10 tohum olmak üzere saksılarda yetiştirildi. Ortalama 20 gün sonunda yaklaşık 10 - 15 cm boylanan taze yapraklar kesilerek naylon torbalara alındı. Bu materyal sıvı azot içinde (-180°C) donduruldu ve kullanılacağı zamana kadar derin dondurucuda (-70°C) saklandı.

Tablo 1: Araştırmada kullanılan yabancı arpa hatları

Arpa hatları	Kütük No	Orijin
532	10431	Ankara - Sarımsaklı
535	10422	Amasya - Merzifon
536	10341	Eğridir
538	59/100	F.A.O
571	6676	Bilecik - Söğüt
579	7079	Yozgat - Boğazlıyan
583	7025	Baladır
587	7213	Çorlu
589	7211	Ankara
590	7222	Yeşilhisar
591	7221	İskilip
592	7220	Eleşkirt
593	7219	Sivas - Yıldızeli
595	7216	Ulukula
598	7230	Sivas - Divriği
600	7227	Kırklareli
601	7226	Gemerek
602	7224	Sivas - Hafik
603	6975	Denizli
607	9091	Erzurum - Orta
610	9082	Malazgirt
634	54/68	Erzurum - Orta
636	8392	Uşak
638	8385	Rize - Pazar

2.1.2 Genomik DNA'nın İzolasyonu

Bitki materyalinden genomik DNA'nın eldesi için Walbot (1988) yöntemi kullanıldı. Bunun için her hattan yetiştirilen 10 fideden yaklaşık 2 gr bitki yaprağı bir miktar sıvı azot ve 0.5 ml ezme tamponu (Tablo 2) ile steril porselen havanda homojenize edildi. Daha sonra homojenat, 1.5 ml'lik steril mikrotüplere alınarak 5000 devir / dakika'da 5 dakika santrifüj (Eppendorf, 5415) edildi. Üst sıvı atılarak, nükleusları içeren bir çökelti elde edildi. Bu çökelti 0.3 ml süspansiyon tamponu (Tablo 2) ve 20 µl %20 sodyum dodesil sülfat (w/v) ile süspansiyon haline getirildi. Tüpler 70°C'de su banyosunda 15 dakika tutuldu. 150 µl 7.5 M amonyum asetat çözeltisi eklendikten sonra, tüpler yavaşça karıştırıldı ve 30 dakika buzda bırakıldı. 15000g'de 5 dakika santrifüj edilerek amonyum dodesilsülfat çöktürüldü. Üst sıvı yeni bir tüpe aktarıldı, 0.7 ml soğuk izopropanol eklendi ve 15 dakika buzda bekletildi. DNA, 4°C'de 5 dakika 14000 devir / dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Üst sıvı atıldı ve tüpler kurutma kağıdı üzerinde ters çevrilerek birkaç dakika tutuldu. Pellet, 25 µl Tris - EDTA tamponunda (Tablo 2) çözündürülerek aynı örneğe ait tüm tüplerdeki solusyon tek bir tüpte toplandı. Solusyonlardaki RNA'yı uzaklaştırmak için farklı örnekleri içeren bu tüplere 10µl RNaz (10 mg/ml) enzimi eklendi ve 37°C'de 15 dakika inkübe edildi. Solusyona eşit hacim fenol - kloroform (Kloroform: izoamilalkol 24:1) eklendi. Tüpler 5-10 kez ters çevrilerek yavaşça karıştırıldı ve 14000 devir / dakika'da 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı yeni bir tübe aktarılarak, aynı işlem bir kez daha tekrarlandı. Üst sıvı yeni bir tübe alındı ve final konsantrasyonu 0.3 M olacak şekilde sodyum asetat (3 M, pH 5.2) eklendi. İki hacim soğuk etanol eklenerek derin dondurucuda (-70°C) 30 dakika bekletildi. Tüpler daha sonra 15000g'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı ve pellet 1 ml %70 soğuk etil alkol ile yıkanarak tekrar 15000g'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı, pellet kurutuldu ve 50 µl Tris - EDTA tamponunda çözüldü.

Bu DNA solusyonları uygun oranda sulandırılarak, UV - Spektrofotometre (Milton Roy, 601)'de absorpsiyon değerlerine bakıldı ve çift zincirli DNA konsantrasyonu hesaplandı.

DNA konsantrasyonunun hesaplanmasında;

" $OD_{260} \times 50 \times \text{Seyreltme oranı}$ " (Maniatis T. ve ark., 1982) formülü kullanıldı. Genomik DNA örnekleri (-20°C)'de derin dondurucuda saklandı.

Tablo 2: DNA izolasyonunda kullanılan tamponlar.

Tampon	İçerik	
Ezme tamponu	Sukroz	%15 (w/v)
	Tris HCl, pH 8.0	50 mM
	EDTA	50 mM
	NaCl	250 mM
Süspansiyon tamponu	Tris HCl, pH 8.0	20 mM
	EDTA	10 mM
Tris-EDTA Tamponu	Tris HCl, pH 8.0	10 mM
	EDTA	1 mM

2.2 POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR) İLE GENOM PARMAK İZİNİN ÇIKARILMASI

Arpa hatlarından elde edilen genomik DNA'lardan, Williams J. G.K ve ark. (1990) ile Welsh J. ve McClelland M. (1990) tarafından önerilen RAPD yöntemi ile rastgele bölgeler çoğaltılarak genomik parmak izleri çıkarıldı.

2.2.1. Primerler

Çalışmada 20 nükleotidlik 2 farklı primer kullanıldı. Bu primerlerin baz dizileri aşağıdaki gibidir;

Primer 1; 5' ACTTAGACCTCACCTGTGG 3'

Primer 2; 5' GCACTGACCTCCCACATTCC 3'

Primerler TÜBİTAK, MAM Biyoloji Bölümü laboratuvarlarında sentezlendi ve derin dondurucuda (-20°C) saklandı. Bu primerler, insan β -globin geni ile ilgili primerler olup arpa DNA'sı için rastgele diziler içermektedir.

2.2.2 Enzim

Genomik DNA'nın çoğaltımında, termostabil bir enzim olan *Taq* DNA polimeraz (Boehringer Mannheim) kullanıldı. Bu enzim derin dondurucuda (-20°C) saklandı.

2.2.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu için örneklerin hazırlanması

Polimeraz Zincir Reaksiyonu 0.5 ml.lik polipropilen tüplerde 25 μ l.lik toplam reaksiyon hacminde gerçekleştirildi. Tüplere çeşitli bileşenler Tablo 3'de görülen miktar ve sıra ile konuldu.

95°C'de 10 dakika olarak yapılan ilk denatürasyon aşamasından sonra tüplere 0.5 unite *Taq* polimeraz enzimi (Boehringer Mannheim) eklendi. Reaksiyon, tüplere eşit hacimde (25 μ l) mineral yağ eklenerek sürdürüldü.

Tablo 3: Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nda kullanılan bileşenler

Bileşen	μ l	Final konsantrasyon
ddH ₂ O	17	
Taq Polimeraz İnkubasyon tamponu 10 x	2.5	1x
[Tris - HCl 100 mM KCl 500 mM gelatin 1mg / ml., pH8.3]		
MgCl ₂ tamponu (20 mM)	2.5	2.0 mM
PCR-dNTP karışımı	1	100 μ M
[dATP 25 mM dGTP 25 mM dCTP 25 mM dTTP 25 mM]		
Primer (0.5 μ g/ μ l)	1	20 ng
Genomik DNA	2.5	1 ng
(sulandırım oranı: 1:37)		

2.2.4 Termal - saykır'ın Programlanması

95°C'de 10 dakika olarak yapılan ilk denatürasyon ve Taq DNA polimerazın eklenmesinden sonraki ilk 4 döngü;

1. segment 1.5 dakika 95°C
2. segment 1.5 dakika 36°C
3. segment 3 dakika 72°C

ve daha sonraki 40 döngü ise aşağıdaki sürelerle gerçekleştirildi.

1. segment 0.5 dakika 95°C
2. segment 0.5 dakika 36°C
3. segment 1 dakika 72°C

40 döngü sonunda tüpler 72°C'de 10 dakika bırakılarak reaksiyon tamamlandı. PCR ürünleri analizleri yapılana dek -20°C'de saklandı.

2.2.5 PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi İçin Hazırlanması

PCR ürünlerinin etanol ile çöktürülmesi aşamasında her bir reaksiyon tübünden 22 µl örnek alınarak 1:10 oranında sodyum asetat (3M, pH 5.2) ve 2 hacim soğuk etanol (%99.5) eklendi. Tüpler sıvı azota batırılarak veya derin dondurucuda (-70°C) 30 dakika bırakılarak donduruldu. Bu sürenin sonunda, tüpler +4°C'de 13000 devir / dakikada santrifüj edildi, pellet vakumlu kurutucuda kurutuldu ve distile suda çözüldü.

2.2.6 Agaroz Jel Elektroforezi

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ürünlerinin analizi için %1.2'lik agaroz jeller kullanıldı.

1.2 gr. agaroz 100 ml. 1xTBE tamponu (Tablo 4) içerisinde tamamen eritildi. Bu jele 5 µl. etidyum bromür solusyonundan (10 mg/ml) eklendi ve sıcaklığının 55°C-60°C'ye düşmesi beklendi. Daha sonra jel, bir elektroferez kasetine döküldü. 30 dakikada polimerize olan jel, 1xTBE içeren elektroferez tankına yerleştirildi ve jel kuyuları bu tampon ile yıkandı.

Her bir PCR örneği, yükleme tamponu (Tablo 4) ile karıştırılarak 12 µl olarak gel kuyularına yüklendi. 1-2 dakika örneklerin kuyu diplerine çökmesi için beklendi.

Tablo 4: Agaroz jel elektroferezinde kullanılan tamponlar.

Tampon	İçerik	
Tris-borat (TBE) tamponu (5x)	Tris bazı	90 mM
	Borik asit	90 mM
	EDTA, pH 8,2	2 mM
Elektroferez yükleme tamponu (6x)	Bromofenol mavisi	% 0.25
	Sukroz	% 40 (w/v)

PCR ürünleri 70 volt ve serbest akım altında belirli sürelerde yürütüldü. Örnekler, jelin içerdiği etidyum bromür aracılığı ile UV altında gözlemlendi ve Type 52 polaroid film ile fotoğraflandı.

2.3 POLİMORFİZM ORANININ HESAPLANMASI

Hatlar arası DNA düzeyindeki farklar aşağıda verilen formüle (Nei, M. ve Li W.H, 1979) göre hesaplandı.

$$F = \frac{2 M_{xy}}{M_x + M_y}$$

F = Benzerlik oranı

M_{xy} = İki hat içinde aynı uzunluktaki toplam RAPD fragmenti sayısı

M_x = X hattındaki RAPD fragmentlerinin sayısı.

M_y = Y hattındaki RAPD fragmentlerinin sayısı.

1 - F = Polimorfizm oranı

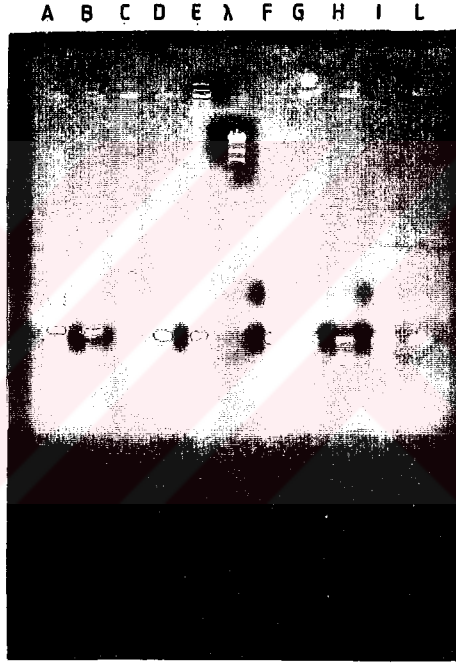
Sonuçlar % cinsinden tablo halinde verildi.

3. BULGULAR

3.1. PCR KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU

3.1.1. Çeşitli MgCl₂ Konsantrasyonlarının Çoğaltım (Amplifikasyon) Üzerine Etkileri

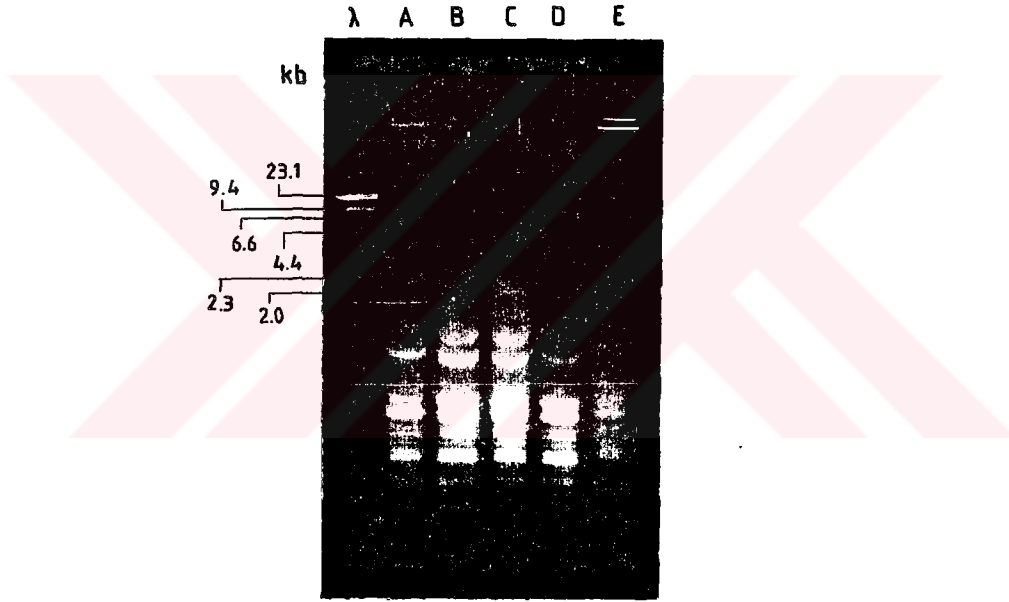
Arpa genomik DNA'sının PCR ile çoğaltımında, MgCl₂'ün değişen konsantrasyonlarının reaksiyon üzerine etkileri araştırıldı. Zafer - 160 arpa çeşidinden saflaştırılan genomik DNA'nın, 1. primer ile çoğaltımında, 1.8 ve 3.0 mM aralığındaki MgCl₂ konsantrasyonları denendi. Standart Polimeraz Zincir Reaksiyonu koşullarında gerçekleştirilen bu denemelerin sonucunda yaklaşık 0.2 ve 0.4 kb aralığında çeşitli bantlar elde edildi (Şekil 1).



Şekil 1: Farklı zamanlarda yetiştirilmiş iki kontrol arpa bitkisinin 1. primer ile çeşitli $MgCl_2$ konsantrasyonlarında verdiği PCR ürünlerini gösteren %1.2'lik agaroz jel. A-F; 1.8 mM, B-G; 2.0 mM, C-H; 2.2 mM, D-I; 2.5 mM, E-L; 3.0 mM $MgCl_2$. DNA boyut markırı olarak, Hind - III kesimi lambda (λ) DNA kullanıldı. Örnekler, 70 V'da 3 saat yürütülerek, etidyum bromür ile boyandıktan sonra görüntülendi.

Zafer - 160 arpa çeşidine ait genomik DNA örnekleri, 2. primer ile 1.5, 1.7, 2.0, 2.2 ve 2.5 mM MgCl₂ konsantrasyonlarında çoğaltıldı ve Şekil 2'deki sonuçlar elde edildi.

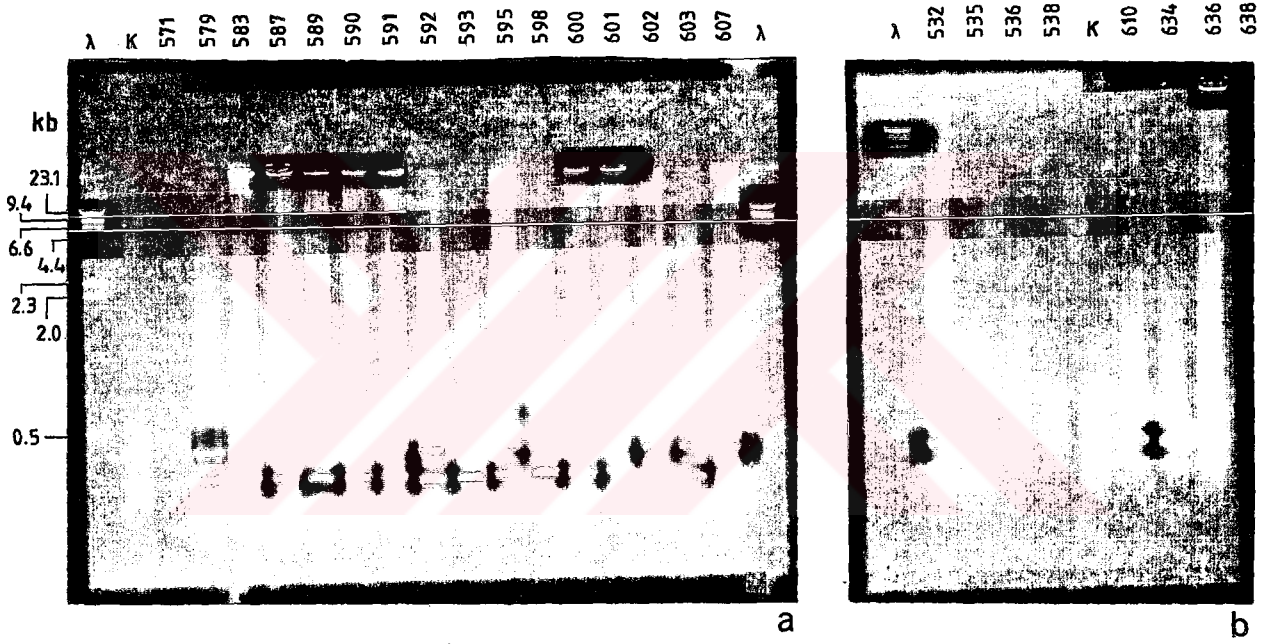
Şekil 1 ve 2'de gözlenen sonuçlardan 2.0 mM; optimum MgCl₂ konsantrasyonu olarak belirlendi ve yabancı arpa hatlarının PCR ile çoğaltımında bu konsantrasyon kullanıldı.



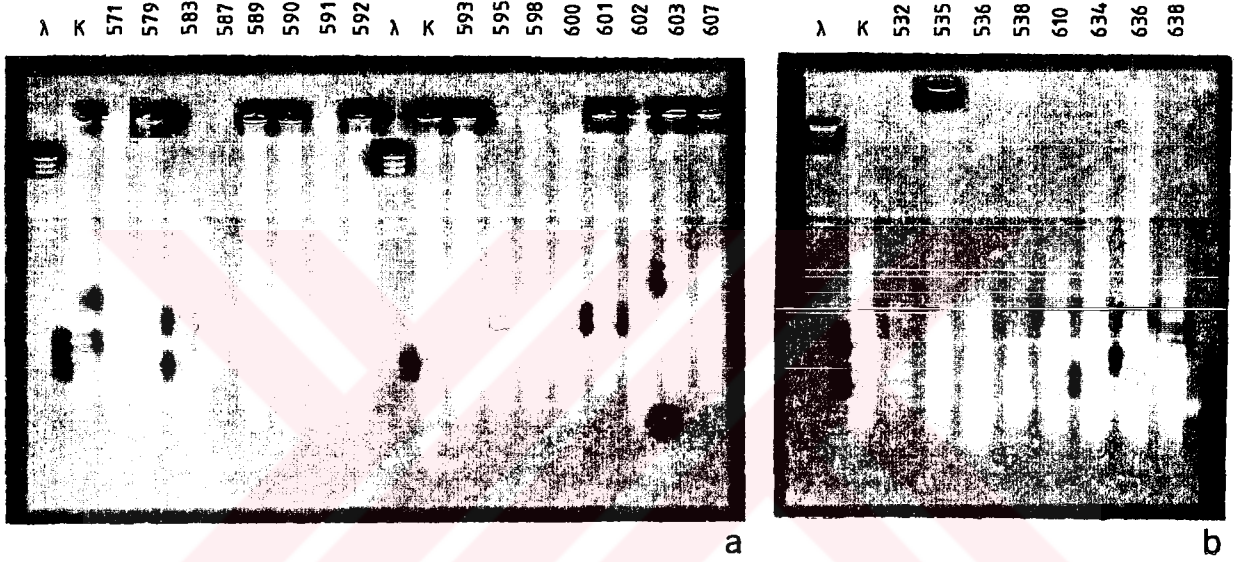
Şekil 2: Kontrol arpa bitkisinin, 2. primer ile A; 1.5 mM, B; 1.7 mM, C; 2.0 mM, D; 2.2 mM; E; 2.5 mM MgCl₂ konsantrasyonlarında çoğaltımını gösteren %1.2'lik agaroz jel. Örnekler, 70 V'da 3 saat yürütüldü.

3.2. YABANI ARPA HATLARININ GENOMİK PARMAK İZLERİNİN ÇIKARILMASI

24 arpa hattına ait DNA'lar, Gereç ve Yöntem'de (2.1.2) anlatılan metod ile izole edildi ve RAPD (Welsh J. ve McClelland M., 1990; Williams J.G.K. ve ark., 1990) tekniği ile 1. ve 2. primerler kullanılarak, herbir arpa hattına özgül parmak izleri elde edildi. Agaroz jel elektroforezi ile elde edilen sonuçlar Şekil 3 ve 4'de görüldüğü gibidir.



Şekil 3a,b:Tablo 1'de verilen yabancı arpa hatlarına ait DNA örneklerinin primer 1 (5' ACTTAGACCTCACCCCTGTGG3') ile çoğaltımı sonucu elde edilen genomik parmak izleri. Kontrol (K) materyali olarak, Zafer - 160 arpa çeşidi DNA'sı kullanıldı. PCR; 25 ng genomik DNA, 2.0 mM MgCl₂, 20 ng primer 1, 100 µM dNTP karışımı, 0.5 unit *Taq* DNA polimeraz ile gerçekleştirildi. PCR ürünleri, etanol (%99.5) ile çöktürüldükten sonra, TE tamponu içinde çözülerek %1.2'lik agaroz jele 12 µl olarak yüklendi. Örnekler 70 V'da 3 saat yürütüldü.



Şekil 4 a, b: Çeşitli arpa hatlarından izole edilen total DNA'nın PCR ile çoğaltımı ile elde edilen parmak izleri. Reaksiyon 25 ng genomik DNA, 20 ng primer 2(5' GCACTGACCTCCCACATTCC 3'), 2.0 mM MgCl₂, 100 µM dNTP karışımı ve 0.5 unit *Taq* DNA polimeraz enzimini içeren toplam 25 µl'lik hacimde gerçekleştirildi. 95° C'de 10 dakikalık ilk denatürasyon sonunda, ilk 4 döngü 95° C'de; 1.5, 36° C'de; 1.5 ve 72° C'de; 3 dakika, sonraki 40 döngü 95° C'de; 0.5, 36° C'de; 0.5 ve 72° C'de; 1 dakika olarak yapıldı ve tüpler 72° C'de 10 dakika tutularak reaksiyon tamamlandı. 1XTBE tamponu ve etidyum bromür içeren %1.2'lik agaroz jele 12 µl olarak yüklenen örnekler, 70 V'da 3 saat yürütülerek, fotoğraflandı.

3.2.1. Arpa Hatları Arasındaki Polimorfizmin İncelenmesi

1. Primer ile elde edilen ve Şekil 3'te görülen 4 RAPD markırının arpa hatlarına göre dağılımı Tablo 5'te verildi. Şekil 4'te tespit edilebilen 10 RAPD markırı ise Tablo 6'da görüldüğü gibidir. Herbir arpa hattı arasındaki polimorfizm oranları Gereç ve Yöntem'de verilen formüle (Nei M. ve Li W.H., 1979) göre, her 2 tablodan yararlanılarak hesaplandı ve ortalama polimorfizm oranları verildi (Tablo 7).

Tablo 7'den izlenebileceği gibi 2. primer ile yapılan çalışmada, en yüksek polimorfizm oranı, 595 ve 602'nolu arpa hatları arasında %15 olarak belirlendi. Zafer - 160 arpa çeşidi ile 579 ve 589 no'lu hatlar en yüksek farklılığı (%10) gösterdi. Buna karşın 590, 591, 592 598 ve 600 no'lu hatların Zafer - 160 ile en düşük polimorfizm oranını (%3) gösterdiği saptandı.

Tablo 7: Şekil 3 ve 4'ten elde edilen verilere göre arpa hatları arasındaki (%) polimorfizm oranları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	Zafer-160																			
2	535	9	-																	
3	536	9	-																	
4	579	10	13	13																
5	583	-	9	9	10															
6	589	10	6	6	7	10														
7	590	3	6	6	13	3	13													
8	591	3	6	6	13	3	13													
9	592	3	6	6	13	3	13													
10	593	-	9	9	10	-	3	3	3	3										
11	595	6	9	9	10	6	3	3	3	6										
12	598	3	6	6	13	3	13			3	3									
13	600	3	6	6	13	3	13			3	3									
14	601	4	13	13	7	4	7	6	6	6	4	4	6	6						
15	602	7	10	10	12	7	12	10	10	7	15	10	10	12	-					
16	603	-	9	9	10	-	10	3	3	3	6	3	3	4	7					
17	607	4	13	13	7	4	7	6	6	6	4	6	6	-	12	4				
18	610	9	-	-	13	9	6	6	6	9	9	6	6	13	10	9	13			
19	634	6	3	3	9	6	9	3	3	6	6	3	3	9	13	6	9	3		
20	636	9	-	-	13	9	6	6	6	9	9	6	6	13	10	9	13			

4. TARTIŞMA

Çeşitli örneklerin, RAPD tekniği ile genetik parmak izi çıkarılarak tanımlanmasında, çoğaltım reaksiyonu koşullarının optimizasyonu gereklidir. Genellikle, DNA polimeraz enzimi, $MgCl_2$ ve genomik DNA'nın konsantrasyonları, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'nin veriminde önem taşır (Bassam B.J. ve ark., 1991).

Bu çalışmada, kontrol (Zafer - 160) arpa bitkisi DNA'sının 1. primer ile yapılan çoğaltım reaksiyonlarında $MgCl_2$ 'ün değişen (1.8, 2.0, 2.2, 2.5, 3.0 mM) konsantrasyonları içerisinde 2.0 mM final konsantrasyon optimum seçilerek, yabancı arpa hatlarının çoğaltımında bu konsantrasyon kullanıldı. Aynı bitki DNA'sının 2. primer ile çoğaltımında; 1.5, 1.7, 2.0, 2.2 ve 2.5 mM $MgCl_2$ konsantrasyonları kullanıldı ve bantların net olarak gözlenebildiği 1.7 - 2.2 mM aralığı optimum $MgCl_2$ konsantrasyonu olarak belirlendi. Bununla beraber, 2.5 mM'in üstündeki $MgCl_2$ 'ün arpa DNA'sının çoğaltımında sınırlayıcı olduğu gözlemlendi (veriler gösterilmedi). Bu bulgu, literatürde bitki RAPD markırlarının eldesine yönelik bazı çalışmalara benzerlik göstermektedir. Örneğin; Halward T. ve ark. (1992) yer fıstığı bitkisinde, Williams J.G.K. ve ark. (1990) soya fasulyesinde, $MgCl_2$ konsantrasyonu olarak 2.0 mM'i kullanmışlardır.

Çalışmada arpa DNA örneklerinin çoğaltımında kullanılmak üzere rastgele nükleotit dizisine sahip 2 primer seçilmiştir. 20 nükleotit uzunluğundaki bu primerler yaklaşık % 50 GC içeriğine sahiptir. Williams J.G.K ve ark. (1990) yaptıkları çalışmalarda, primer uzunluğunun ve primerin GC içeriğinin çoğaltımdaki rolünü

araştırmışlar ve sonuç olarak RAPD reaksiyonlarında kullanılabilir minimum primer uzunluğunun 9 nükleotit ve uygun Guanin, Sitozin (GC) oranının; %40 ve daha fazlası olabileceğini ortaya koymuşlardır. Klein-Lankhorst R.M. ve ark. (1991) ile Hu J. ve Quiros C.F. (1991) çeşitli sebze türlerinde yaptıkları RAPD çalışmalarında %50-80 GC içeriğine sahip, 10-20 nükleotit uzunluğunda primerler kullanarak, çok sayıda RAPD markırları elde etmişlerdir. Welsh J. ve McClelland M. (1990) %50'nin üstündeki GC içeriğinin ve PCR'de kullanılan düşük bağlanma sıcaklığının primerin kalıp DNA ile yanlış eşleşme oranını arttırdığı ve böylece daha fazla bölgeye bağlandığını belirlemişlerdir.

Bu çalışmada düşük bağlanma sıcaklığı (36°C) kullanılarak, PCR ürünü miktarı arttırılmaya çalışılmıştır. Williams J.G.K. ve ark. (1990) aynı bağlanma derecesinde yaptıkları çalışmalarda insan, mısır ve maya'da çok sayıda RAPD markırı elde etmişlerdir. Halward T ve ark. (1992) ile Klein - Lankhorst R.M. ve ark. (1991), bağlanma sıcaklığı olarak; 35°C, Goodwin P.H. ve Annis S.L. (1991) ise 34°C 'yi kullanmışlardır. Buna karşın, Welsh J. ve McClelland M. (1990), sadece ilk 2 döngü de düşük bağlanma sıcaklığını (40° C) kullanarak, sonraki 30-40 döngü için reaksiyonu yüksek bağlanma sıcaklığında (60°C) sürdürmüşlerdir.

Çalışmada, Zafer - 160 ve yabancı arpa hatlarının 1. primer ile çoğaltımında elde edilen 0.3 - 1.0 kb aralığındaki bantların genellikle monomorfik karakterde olduğu gözlemlendi. 2. primer ile yapılan polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda özgül parmak izlerini oluşturan çeşitli polimorfik bantlar elde edildi. 10 RAPD markırı değerlendirilerek, en yüksek polimorfizm oranı; 595 ve 602 no'lu arpa hatları arasında; %15 olarak belirlendi. Zafer - 160 arpa çeşidi ile 579 ve 589 no'lu hatlar arasında en yüksek polimorfizm %10 oranında gözlenirken, Zafer 160 ile, 590, 591, 592, 598, 600 no'lu hatlar arasındaki polimorfizm %3 olarak belirlendi.

Diğer yandan RAPD reaksiyonlarında nükleotit dizileri farklı primerlerin seçimi, elde edilebilecek polimorfik (çeşitlilik gösteren) ya da monomorfik (benzerlik gösteren) bantların oranını etkilemektedir. Yüksek oranda poliformik bantlar, çoğunlukla hatlar arasındaki polimorfizmin ortaya çıkarılmasında, buna karşın daha yüksek oranda monomorfik bantlar organizmaları tür seviyesinde karakterize etmede kullanılmaktadır (Caetano - Anollés G. ve ark., 1991).

Bu sonuçlar, RAPD tekniğinin, arpa hatları arasında genomik "parmak izi" çıkarılarak çeşitliliğin tanımlanmasında uygun ve etkili bir yol olduğunu göstermektedir. Ülkemiz yabancı arpa materyalinde polimorfizmin varlığı bu materyalin, üstün nitelikli arpa çeşitlerinin elde edilmesinde kullanılabilirliğini göstermesi bakımından önem taşımaktadır.

Bunun yanısıra, arpa hatlarından elde edilen genomik parmak izleri çeşitlerin belirlenmesinde ve olası tohum karışıklıklarını önlemede kullanılabilir. Hu J. ve Quiros C.F. (1991), tohum pazarlayan şirketlere ait 12 *Brassica oleracea* L. kùltivarı ile yaptıkları RAPD çalışmalarında, bunlar arasında %7.9 oranında polimorfizm olduğunu saptamışlar ve bu değerlerin çeşitlerin belirlenmesinde kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Bu çalışmada hatlar arasında özellikle 2. primer bakımından bulunan RAPD polimorfizmi, bu hatlar arası melezlerin F₂ dölllerinde oluşacak açılımdan yararlanılarak, genetik haritaların kurulmasında da kullanılabilir. RAPD markırları ile tarımsal bakımdan önemli karakterleri idare eden genler arasında bulunabilecek sıkı bağlantılar, bu karakterlerin RAPD markırları ile daha kolay ve ucuz seleksiyonunu sağlayabilir.

Sonuç olarak, bu çalışmada Türkiye'de yetişen yabancı arpa hatları arasında bir varyasyonun olduğu saptanmıştır. Ülkemizin bu bitki açısından önemli bir gen merkezi olması da gözönüne alındığında, bu çeşitlilik; ıslah çalışmalarında önemli bazı karakterlerin kültür çeşitlerine aktarılması açısından önem taşır. Bu çalışma ile arpa için optimize edilen RAPD tekniğinin arpa çeşitlerinin identifikasyonu ile tohum karışıklığı (safiyeti)'nin belirlenebilmesinde kolaylıkla kullanılabilceği anlaşılmıştır. Daha ileri aşamada, hatlar arası çeşitliliğin (polimorfizm) düzeyi belirlenerek arpa'da RAPD genetik haritalarının çıkarılabilmesine zemin hazırlamıştır.



5. ÖZET

ARPADA ÇEŞİTLİLİĞİN MOLEKÜLER DÜZEYDE TANIMLANMASI

Bu çalışmada, Türkiye orijinli arpa hatları arasındaki çeşitlilik, moleküler düzeyde RAPD (Random amplified polymorphic DNA) tekniği ile karşılaştırmalı olarak araştırıldı.

Deneylerde, kontrol materyali olarak kullanılan Zafer-160 arpası ile 24 yabancı arpa hattına ait bitki yapraklarından DNA izole edilerek, bu DNA örnekleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı. PCR'da rastgele seçilmiş 20 nükleotitlik 2 primer kullanıldı.

Genomik DNA'ların 1. primer ile çoğaltılması sonucu, bir çok monomorfik bant elde edildi. 2. primeri içeren PCR sonucunda ise monomorfik bantların yanısıra polimorfik bantların varlığıda gözlemlendi. Bu bantlar içerisinde 10 RAPD markırı değerlendirilerek hatlar arası polimorfizm oranı hesaplandı. Polimorfizm oranlarının %3-15 arasında değiştiği gözlemlendi.

Sonuç olarak, 19 arpa hattı ile Zafer - 160 arpa çeşidinden elde edilen genoma özgül parmak izlerinin ortaya koyduğu polimorfizmin tohum karışıklıklarının önlenmesinde ve genetik haritaların kurulmasındaki potansiyeli tartışıldı.

6. SUMMARY

IDENTIFICATION OF THE VARIATION In BARLEY at THE MOLECULAR LEVEL.

In this study, the variation between wild barley lines have comparatively been investigated at the molecular level with Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique.

Leaf DNAs extracted from 24 different barley lines and the control Zafer-160 barley variety were amplified with the use of Polymerase Chain Reaction (PCR). Randomly chosen two primers with 20 nucleotides in length were used in PCR.

Many monomorphic bands were obtained as a result of the amplification of genomic DNAs with the first primer. When genomic DNAs were amplified with the second primer, in addition to monomorphic bands, a lot of polymorphic bands were also observed.

Ten RAPD markers were evaluated in these bands and the rates of polymorphism between the lines were determined. The rates of polymorphism were found between 3-15 %.

The potential of genomic fingerprints and the polymorphism related to the different barley lines were discussed in seed selection and the construction of genetic maps.

7. KAYNAKLAR

ANDERSEN W. R. ve FAIRBANKS D. J. (1990). Molecular Markers: Important Tools for Plant Genetic Resource Characterization. *Diversity*. 6:51-53.

BASSAM B.J., CAETANO - ANOLLÉS G. ve GRESSHOFF P.M. (1991). DNA amplification fingerprinting and its potential application for genome analysis. Current Topics in Plant Molecular Biology, Vol. 1 Ed: P.M. Gresshoff, s. 8 - 16 Chapman and Hall, New York.

BERNATSKY R. ve TANKSLEY S.D. (1989). Restriction fragments as molecular markers for germplasm analysis and utilisation. The Use of Plant Genetic Resources. Ed: A.D.H. Brown D.R. Marshall, s. 353 - 362. Cambridge University Press, Cambridge.

BOTHMER R. von, JACOBSEN N., BADEN C., LİNDE - LAURSEN I. ve JORGENSEN R.B. (1991). An ecogeographical study of the genus *Hordeum*. Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Genepools 7. International Board for Plant Genetic Resources, Rome.

BOTSTEIN D., WHITE R.L., SKOLNICK M. ve DAVIS R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 32: 314-331.

CAETANO - ANOLLÉS G., BASSAM B.J. ve GRESSHOFF P.M. (1991). DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology*. 9: 553 - 557.

DOEBLEY J.F., GOODMAN M.M. ve STUBER C.W. (1985). Isozyme variation in the races of maize from Mexico. *American Journal of Botany*. 72: 629 - 639.

ERLICH H.A., GELFAND D. ve SNINSKY J.J. (1991). Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*. 252 : 1643 - 1650.

GOODWIN P.H. ve ANNIS S.L. (1991). Rapid identification of genetic variation and pathotype of *leptosphaeria maculans* by random-amplified polymorphic DNA assay. *Applied and Environmental Microbiology*. 57 (9): 2482 - 2486.

GRAUL A.I. (1989) Automated gene amplification based on PCR technique. *Drug News and Perspectives*. 2(2): 94-98.

HALWARD T., STALKER T., LARUE E. ve KOCHERT G. (1992). Use of single - primer DNA amplification in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea L.*). *Plant Molecular Biology*. 18: 315 - 325.

HU J. ve QUIROS C.F. (1991). Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Reports* 10: 505-511.

International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), Geneflow, June, 1989.

KLEIN - LANKHORST R.M., VERMUNT A., WEIDE R., LIHARSKA T. ve ZABEL P. (1991). Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) *Theor. Appl. Genet.* 83: 108-114.

LAURIE D.A., SNAPE J.W. ve GALE M.D. (1992). DNA Marker Techniques for Genetic Analysis in Barley. Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology. Ed: P.R. Shewry. s. 115 - 132. The Alden Press, Oxford.

MANIATIS T., FRITSCH E.F. ve SAMBROOK J. (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York.

MULLIS K.B. ve FALOONA F.A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via the polymerase catalyzed reaction. *Meth. Enzymol.* 255: 335 - 350.

NEI M. ve LI W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 5269 - 5273.

OCHMAN H., GERBER A.S. ve HARTL D.L., (1988). Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics.* 120 : 621 - 623.

SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B. ve ERLICH H.A. (1988). Primer - directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase *Science* 239 : 487 - 491.

SHEWRY P. R. (1992) Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology. The Alden Press, Oxford.

SMITH J.S.C. (1988). Diversity of United States hybrid maize germplasm; isozyme and chromatographic evidence. Crop Science. 28: 63 - 69.

TANKSLEY S.D., YOUNG N.D., PATERSON A.H. ve BONIERBALE M.W. (1989). RFLP mapping in plant breeding new tools for an old science. Biotechnology. 7: 258 - 264.

TOSSEL W.E. (1991). International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) Annual Report. s. 4-5.

WALBOT V. (1988). Preparation of DNA from single rice seedlings. Rice Genet. Newslett. 5:149 - 151.

WELSH J. ve McCLELLAND M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research. 18 (24): 7213 - 7218.

WILLIAMS J.G.K., KUBELIK A.R., KENNETH J.L., RAFALSKI J.A. ve TINGEY S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research. 18(22): 6531 - 6535.

WILSON H.D. (1988). Quinoa biosystematics I : domesticated populations. Economic Botany. 42: 461 - 477.

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**