

Arpa Mikrosatelitlerinin Ekmeklik Buğdaydaki Genetik Çalışmalar İçin Kullanım Olanaklarının Araştırılması

E. Banu BÜYÜKÜNAL BAL

KSÜ, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kahramanmaraş

ÖZET

Genomik çalışmalar çoğu bitkinin oldukça büyük genoma sahip olmaları ve kompleks genom yapısı göstermeleri nedeniyle yavaş ilerleme göstermektedir. Bu nedenle bir bitki türünden elde edilen araştırma sonuçlarının o tür ile genetik ilişkisi olabilecek bir başka tür üzerinde uygulanabilirliğinin araştırılması önem kazanmaktadır. Bu çalışmada, Türkiye’de fazla miktarda yetiştirilen bir ekmeklik buğday çeşidi olan ‘Gerek-79’ün DNA’sı 29 arpa mikrosatelitinin her birine özgü polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır. Buğdaydan elde edilen radyoaktif PCR ürünleri, daha önce arpada bu primerlerin kullanılması sonucu elde edilmesi muhtemel ürünlerin alel uzunlukları ile karşılaştırılmıştır. Alel uzunluklarına göre buğdayda benzer uzunlukta amplifikasyon ürünleri oluşturan mikrosatelitler HVM15, HVM20, HVM23, HVM26, HVM31, HVM36, HVM40, HVM44, HVM54 ve HVM62 olarak saptanmıştır. Bundan sonraki çalışmalarda belirlenen mikrosatelitlerin farklı buğday çeşitlerindeki polimorfizm özellikleri saptanarak, buğday genotiplendirme çalışmalarında kullanılma olasılığı incelenecektir.

Anahtar Kelimeler: Mikrosatelit, buğday, arpa, PCR

Evaluation of Barley Microsatellites for Genetic Studies in Bread Wheat

ABSTRACT

Genome related studies have been progressed slowly in most plants due to their large genome size and complex genome structure. Therefore it is becoming important to evaluate applicability of results belonging to certain species for other species that can be genetically linked. In this study, DNA from a bread wheat variety ‘Gerek-79’, growing in wide area of Turkey, was amplified with 29 barley microsatellite primers by PCR. Allele sizes of radioactively labeled PCR products were compared with those obtained with same primers in barley. Based on allele sizes, microsatellites producing products at similar length for wheat were determined as HVM15, HVM20, HVM23, HVM26, HVM31, HVM36, HVM40, HVM44, HVM54 and HVM62. In future studies, level of polymorphism among different wheat varieties will be determined based on those microsatellites from this study and possibility of using them for genotyping studies being addressed.

Key Words: Microsatellite, wheat, barley, PCR

GİRİŞ

Her biri ökaryotik DNA’daki özelliklere dayalı olarak tasarlanan ve kalıtsal olarak izlenebilen moleküler belirleyiciler günümüzde bitki moleküler biyolojisi alanında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Moleküler belirleyicilerin bitki

moleküler biyolojisinde kullanıldığı alanlara örnek olarak bitki genom haritalanması, bir belirleyici yardımıyla ıslah (marker-assisted breeding), gen klonlama, tohum saflığı testleri ve saflık tayini verilebilir (Brown ve ark., 1996; Ayres ve ark., 1997; Röder ve ark., 1998). Bu belirleyicilerden en önemlilerini hibridizasyona dayalı olan restriksiyon parça uzunluğu polimorfizmi (RFLP) (Bolstein ve ark., 1980) belirleyicileri ile Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PCR) dayalı olan rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) (Welsh ve McClelland, 1990), basit dizilim DNA tekrarları (SSR) (Hamada ve ark., 1982), çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi (AFLP) (Vos ve ark., 1995) gibi belirleyiciler oluşturmaktadır. Moleküler belirleyiciler oldukça büyük ve kompleks genom yapısına sahip bitki çeşitlerinde (yulaf ve ekmeklik buğday gibi heksaploid bitkilerde) yapılan çalışmalarda sağladıkları kolaylıklar nedeniyle yoğun bir şekilde kullanılmaktadırlar. Mikrosatellitler olarak da bilinen basit DNA tekrarları birbiri ardına gelen iki ila beş nükleotid ünitesi tekrarları olup tüm genomda dağılmış olarak bulunurlar (Hamada ve ark., 1982; Weber, 1990). Mikrosatellitler kodominant kalıtım özelliği göstermeleri, lokusa özgü olmaları, yüksek bilgi içeriğine sahip olmaları ve PCR ile kolayca tespit edilebilmeleri gibi birçok özellikleri ile tercih edilen bir moleküler belirleyici grubudur. Mikrosatellitler ile ilgili en belirgin dezavantaj ise bir türe ait yeni mikrosatellitlerin elde edilmesidir. Bu işlem çoğunlukla zaman alıcı olup fazla miktarda emek gerektirir. Çünkü genomdaki mikrosatellitleri PCR ile çoğaltmak için tekrar ünitelerinin her iki yanında bulunan belirli DNA dizilimlerine bağlanabilen primerlere gereksinim duyulur. Mikrosatellitlere ait primerlerin tasarlanması ise her mikrosatelit için DNA dizilim bilgisini gerektirir. İhtiyaç duyulan DNA dizilim bilgisi bir organizmaya ait gen bankalarında mevcut dizilimlerden yararlanılarak temin edilebilir. Ancak mevcut bilginin yetersiz kaldığı durumlarda mikrosatelit izolasyonu bu amaca yönelik özel metodlar kullanılarak gerçekleştirilebilir. Geleneksel olarak mikrosatelit izolasyonu yeni mikrosatellitlerin geliştirileceği organizmanın genomik DNA kütüphanelerinin oluşturulmasını gerektirir (Akkaya ve ark., 1992; Senior ve Heun, 1993; Röder ve ark., 1995). Bir sonraki aşamada bu kütüphanede mikrosatelit içeren klonların belirlenmesi ve bu klonların DNA dizilimlerinin elde edilmesi gerekir. Ancak son zamanlarda geliştirilen yeni metodlarla mikrosatellitlerin daha kısa sürede ve daha az emekle elde edilmesi amaçlanmaktadır (Cipriani ve ark., 1999). Bu noktada özellikle bir türe ait mikrosatellitlerin bu tür ile yakın genetik ilişkisi bulunan bir başka türde de kullanılması fikri ön plana çıkmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada arpa mikrosatellitlerinin ekmeklik buğday için kullanılma olanağı incelenmiştir. Bu amaç için Türkiye’de geniş bir alanda yetiştirilen bir ekmeklik buğday çeşidi olan ‘Gerek-79’ün DNA’sı 29 arpa mikrosateline özgü primerler kullanılarak çoğaltılmış ve oluşan PCR ürünlerinin büyüklükleri aynı mikrosatellitlerin arpada kullanılması ile elde edilenler ile karşılaştırılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bitki materyali ve DNA izolasyonu

‘Gerek-79’ çeşidine ait genomik DNA Plaschke ve ark. (1995)’nin kullandığı yöntem ile elde edilmiştir. İzole edilen DNA’nın miktarı spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

Arpa mikrosatelit primerleri

Çalışmada kullanılan 29 arpa mikrosatelite ait primerlerin (HVM) DNA dizilimleri ve arpa için beklenen bazı alel uzunlukları gibi bilgiler literatürden elde edilmiştir (Liu ve ark., 1996). Primerler ticari olarak sentezlenmiştir.

Mikrosatellitlerin tayini

'Gerek-79' DNA'sı 29 arpa mikrosatelite ait primerler kullanılarak PCR'da (MJ Research) çoğaltılmıştır. Her bir PCR reaksiyonu 15 µl reaksiyon hacminde 50 ng genomik DNA, 25 ng primerlerden herbiri, 15 µg BSA, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM dNTP, 1 µl of [³³P]-dATP (3000Ci per mmol), 1X reaksiyon tampon çözeltisi (Amplitaq Gold, Perkin Elmer), 1 U *Taq* DNA polimeraz enzimi (Amplitaq Gold, Perkin Elmer) içerecek şekilde hazırlanmıştır ve hacim steril ddH₂O ile tamamlanmıştır. Amplifikasyonlar aşağıda belirtilen sabit PCR koşulunda gerçekleştirilmiştir. Bu PCR koşulu 95°C'de 4 dakika denatürasyon ile başlayıp, 94°C'de 1 dakika denatürasyon ve 72°C'de 2 dakika uzamayı içeren 20 döngüden oluşmaktadır. Bu döngüler esnasındaki bağlanma sıcaklığı 65°C'den başlatılarak her bir döngüde 0.5°C azaltılarak 55°C'ye düşürülmüştür. Yirmi döngünün bitmesinin ardından 94°C'de 1 dakika denatürasyonu, 55°C'de 1 dakika bağlanmayı ve 72°C'de 2 dakika uzamayı kapsayan ek 20 döngü uygulanmıştır. PCR ürünleri %6 denatüre edici poliakrilamid jellerinde ayrılmıştır (Büyükunal Bal ve Akkaya, 2002). Elektroforez işlemi 85 Watt sabit güçte gerçekleştirilmiştir (BioRad Sequencing System). Jeller 80°C'de 45 dakika kurutulduktan sonra X-Ray filminde (Kodak) otoradyografiye maruz bırakılmıştır. Örnekler ile birlikte radyoaktif olarak işaretli büyüklük belirleyicisi (Gibco-BRL) ve DNA içermeyen negatif PCR kontrolleri jellerde örneklerle birlikte ayrılmıştır. Büyüklük belirleyicisinin işaretlenmesi [³³P]-dATP (3000Ci/mmol) kullanılarak yapılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Günümüzde karşılaştırmalı haritalama çalışmalarına ait veriler birbirleri ile ilişkili fakat farklı türe ait genomlar arasında korunmuş bölgelerin ve doğrusal olarak sıralanmış belirleyicilerin (synteny) varlığını göstermektedir. Devos ve Gale (1997) karşılaştırmalı haritalama çalışmaları ile Triticeae üyelerinden buğday, arpa ve çavdar arasında synteny olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada özellikle cDNA problemleri ile daha fazla synteny tespit etmişlerdir. Bu tip çalışmalarda bir türe ait belirleyicilerin bir başka tür üzerinde kullanılması önemli hale gelmekte ve bilginin türler arası taşınması amaçlanmaktadır (Devos ve ark., 1993; Laurie ve Devos, 2002). Özellikle elde edilmelerindeki güçlükler nedeniyle son yıllarda bir tür için izole edilen mikrosatellitlerin farklı türlerde kullanım olanaklarına yönelik çalışmalar önem kazanmaktadır. Röder ve ark. (1995) 15 buğday mikrosatelit belirleyicisini çavdar (*Secale spontaneum*) ve arpa çeşitlerinde (*Hordeum vulgare*, *H. spontaneum*) da PCR çoğaltımları için kullandıklarında, sadece bir primerin (%6) buğday ve arpa için polimorfik olduğunu saptamışlardır. Benzer şekilde Li ve ark. (2000) 54 arpa mikrosatelit primerlerinin % 26'sının *Avena* mikrosatellitlerini çoğalttığını gözlemlemişlerdir. Aynı çalışmada kullanılan touchdown PCR koşullarının bağlanma sıcaklığının 64°C'den 55°C'ye düşürülmesi yerine 62°C'den 53°C'ye düşürülmesine bağlı olarak çoğaltım ürünü oluşturan mikrosatelit

primerlerinin sayısının %5'ten %26'ya yükseldiği bulunmuştur. Arpa mikrosatelit belirleyicilerinin buğdaya uygulanabilirliğine yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada 29 arpa primeri kullanılarak 'Gerek-79' genomik DNA'sında oluşan çoğaltım ürünleri değerlendirilmiştir.

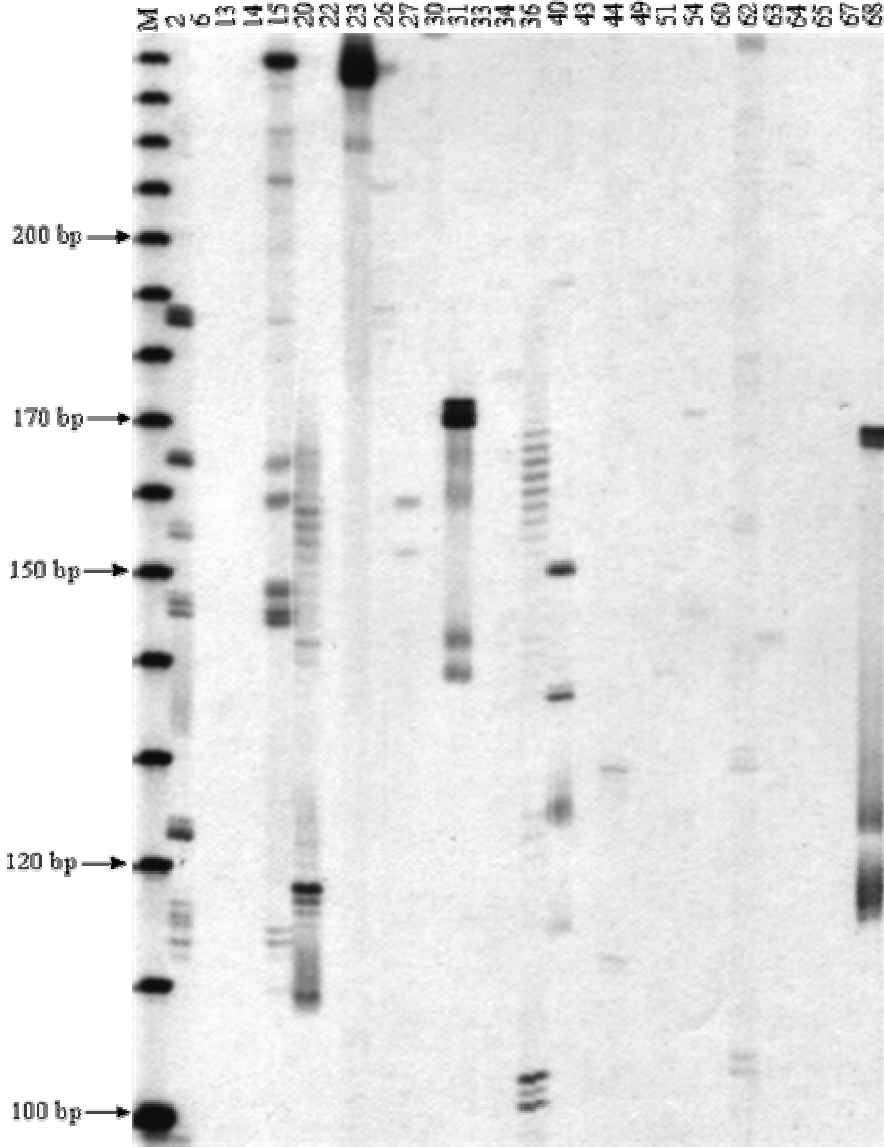
Tablo 1. Bazı arpa mikrosatelitlerine ait primerler ile arpa ve ekmeklik buğdayda tespit edilen alel uzunlukları

Mikrosatelit	Arpada alel uzunluğu aralıkları ¹ (bp)	Arpada sıklıkla görülen alel uzunlukları ¹ (bp)	Buğdaydaki çoğaltım ürünlerinin uzunlukları (bp)
HVM6	168-180	170	-
HVM15*		166	158, 164
HVM20*	130-155	153	118, 158
HVM23*		246	240
HVM26*		206	188, 210
HVM30	145-151	148,149	245
HVM31*	161-165	165	170
HVM33	153-169	155	-
HVM36*	103-151	107	103, 160
HVM40*	139-172	142,159	137, 150
HVM44*		114	112, 128
HVM49	88-145	102	-
HVM54*	144-169	161	145, 170
HVM62*		251	242
HVM64	247-252	251	215

* Benzer uzunlukta çoğaltım ürünü oluşturan mikrosatelitler, ¹Liu ve ark., 1996

Buğdaydaki arpa primerlerinin çoğaltım ürünleri Şekil 1'de gösterilmiştir. Çalışılan primerlerin 13 tanesinin (HVM6, HVM13, HVM14, HVM22, HVM33, HVM34, HVM43, HVM49, HVM60, HVM64, HVM65, HVM67, HVM77) (%45) PCR ile çoğaltım sonrası hiçbir çoğaltım ürünü oluşturmadığı saptanırken, diğer primerler (HVM2, HVM15, HVM20, HVM23, HVM26, HVM27, HVM30, HVM31, HVM36, HVM40, HVM44, HVM51, HVM54, HVM62, HVM63, HVM68) (%55) ile yapılan çoğaltımlarda PCR ürünleri saptanmıştır. Çoğaltım ürünü oluşturan mikrosatelit primerlerinin sayısı diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında farklı türler arasında küçümsenmeyecek oranda fazladır. Ayrıca, çoğaltım ürünü gözlenmeyen HVM43 (Şekil 1) ve HVM77 (Şekilde gösterilmemiştir) gibi primerler için bağlanma sıcaklığı 60°C'nin altında olduğundan uygulanan sabit PCR koşuluna bağlı olarak çoğaltım ürünü tespit edilmemesi muhtemel görülmektedir.

Tespit edilen ürünlerin uzunlukları büyüklük belirleyicisi yardımı ile baz çifti (bp) olarak belirlenmiştir. Oluşan bu ürünlerin büyüklükleri daha önce aynı primerlerin arpa çeşitlerinde kullanılması sonucu elde edilenler ile karşılaştırılmıştır (Tablo 1 ve Şekil 1).



Şekil 1. Arpa mikrosatelit primerleri ile buğdayda elde edilen PCR ürünlerinin denatüre edici jellerde ayrımı sonrası otoradyografi ile gözlemlenmesi. Numaralar, kullanılan arpa mikrosatellitlerinden (HVM) 28 tanesine ait olanları belirtmektedir. "M" 10 bp aralıklarla gözlemlenen ve oklarla belirli bölgeleri gösterilen büyüklük işaretidir.

Sonuç olarak ürün oluşumu gözlenen çok sayıda mikrosatelitler içinde özellikle arpada benzer uzunlukta ürünler oluşturanlar belirlenmiştir. Buna göre benzer uzunlukta ürün oluşturan mikrosatelitler HVM15, HVM20, HVM23, HVM26, HVM31, HVM36, HVM40, HVM44, HVM54 ve HVM62 olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte oluşan ürünlerde mikrosatelitlerin genel tipik görünüşleri, bantların yoğunlukları ve sayıları açısından da farklılıklar gözlemlenmiştir (Şekil 1). Örneğin HVM20 ve HVM36 ile saptanan ürünlerin görünümü mikrosatelitlerin tipik merdiven basamağı şeklindeki görünümüne benzemektedir. Ancak aynı durum HVM31 primeri ile oluşan PCR ürünü için gözlenmemiştir. Yine HVM26, HVM27, HVM30, HVM44, HVM54, HVM62 ve HVM63 gibi belirleyicilere ait primerler kullanılarak elde edilen ürünlere ait bantların yoğunluğu oldukça azdır. Ayrıca otoradyografda HVM2, HVM15, HVM20, HVM23, HVM26, HVM27, HVM31, HVM36, HVM40, HVM44, HVM54, HVM62 ve HVM68 için birden çok bölgede tespit edilen çoğaltım ürünlerinin varlığı bu mikrosatelit primerlerinin çoğaltım esnasında özgün olmayan tarzda hedef DNA'ya bağlanmış olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle daha fazla buğday örneği üzerinde tespit edilen belirleyiciler ile yapılacak daha detaylı çalışmalar polimorfik ürün oluşturan belirleyicileri saptamada ve bu belirleyicilerin buğdayda ne tip uygulamalar (parmakizi ya da karşılaştırmalı haritalama gibi) için kullanılabilmesini göstermesi bakımından önemli olacaktır.

KAYNAKLAR

- Akkaya, M.S., A.A Bhagwat, P.B. Cregan, 1992. Length Polymorphisms of Simple Sequence Repeats DNA in Soybean. *Genetics*, 132:1131-1139
- Ayres, N.M., A.M. McClung, P.D. Larkin, H.F.J. Bligh, C.A. Jones, W.D. Park, 1997. Microsatellite and a Single Nucleotide Polymorphism Differentiate Apparent Amylose Classes in an Extended Pedigree of US Rice Germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 94:773-781
- Brown, S.M., M.S. Hopkins, S.E. Mitchell, M.L. Senior, T.Y. Wang, R.R. Duncan, F. Gonzales-Candelas, S. Kresovich, 1996. Multiple Methods for the Identification Polymorphic Simple Sequence Repeats (SSRs) in Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Theoretical and Applied Genetics*, 93:190-198
- Bolstein, D., R.L. White, M. Skolnick, R.W. Davis, 1980. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphism. *American Journal Human Genetics*, 32:314-331
- Büyükcinal Bal, E.B., M.S. Akkaya, 2002. Assessment of Two Highly Polymorphic Barley Microsatellite Markers for Detecting Polymorphism in Wheat. *Turkish Journal of Biology*, 26:9-12
- Cipriani, G., G. Lot, W.G. Huang, M.T. Marrazzo, E. Peterlunger, R. Testolin, 1999. AC/GT and AG/CT Microsatellite Repeats in Peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: Isolation, Characterization and Cross-species Amplification in *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 99:65-72
- Devos, K.M., T. Millan, M.D. Gale, 1993. Comparative RFLP Maps of the Homoeologous group-2 Chromosomes of Wheat, Rye, and Barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 85:784-792

- Devos K.M., M.D. Gale, 1997. Comparative Genetics into Grasses. *Plant Molecular Biology*, 35:3-15
- Hamada, H., M.G. Petrino, T. Kakunaga, 1982. A Novel Repeated Element with Z-DNA-Forming Potential is Widely Found Evolutionary Diverse Eucaryotic Genomes. *Proceedings of National Academy of Science, USA* 79:6465-6469
- Laurie, D.A., K.M. Devos, 2002. Trends in Comparative Genetics and Their Potential Impacts on Wheat and Barley Research. *Plant Molecular Biology*, 48: 729-740
- Li, C.D., B.G. Rossnagel, G.J. Scoles, 2000. The Development of Oat Microsatellite Markers and Their Use in Identifying Relationships Among Avena Species and Oat Cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 101:1259-1268
- Liu, Z.W., R.M. Biyashev, M.A. Saghai Maroof, 1996. Development of Simple Sequence Repeat DNA Markers and their Integration into a Barley Linkage Map. *Theoretical and Applied Genetics*, 93:869-876
- Plaschke, J., M.W. Ganal, M.S. Röder, 1995. Detection of Genetic Diversity in Closely Related Bread Wheat Using Microsatellite Markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 91:1001-1007
- Röder, M.S., J. Plaschke, S.U. König, A. Borner, M.E. Sorrells, S.D. Tanksley, M.W. Ganal, 1995. Abundance, Variability and Chromosomal Location of Microsatellites in Wheat. *Molecular General Genetics*, 246:327-332
- Röder, M.S., V. Korzun, K. Wendehake, J. Plaschke, M.H. Tixier, P. Leroy, M.W. Ganal, 1998. A Microsatellite Map of Wheat. *Genetics*, 149:2007-2023.
- Senior, M.L., M. Heun, 1993. Mapping Maize Microsatellites and Polymerase Chain Reaction Conformation of the Targeted Repeats Using a CT Primer. *Genome*, 36:884-889
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Pelemen, M. Kuiper, M. Zabeau, 1995. AFLP: A New Technique for DNA Fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23:4407-4414
- Weber, J.L., 1990. The Informativeness of Human (DC-DA) N(DG-DT)N Polymorphism. *Genomics*, 7:524-539
- Welsh, J., M. McClelland, 1990. Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers. *Nucleic Acids Research*, 18:7313-7318