

## Domuz Ayırığı (*Dactylis glomerata* L.) Populasyonlarında Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi

Gürkan DEMİRKOL<sup>1\*</sup> , Özlem ÖNAL AŞCI<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Ordu Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Ordu

(Geliş Tarihi/Recived Date: 05.09.2017; Kabul Tarihi/Accepted Date: 20.11.2017)

### Öz

Domuz ayırığı (*Dactylis glomerata* L.) yaygın olarak bulunan çok yıllık bir yem bitkisidir. Ülkemiz domuz ayırığı populasyonları açısından zengin bir ülkedir. Bu çalışma ülkemizin on bir farklı ilinden toplanan domuz ayırığı populasyonlarının genetik farklılıklarının belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. Toplanan on bir populasyonun genetik farklılıklarının belirlenmesinde on dört adet Basit Dizi Tekrarları (SSR) markörü kullanılmıştır. Çalışma sonucunda 72 allel belirlenmiştir. Locus başına ortalama allel sayısı 5.14 olarak bulunmuş olup, tespit edilen allel sayısı 2-12 arasında değişiklik göstermiştir. Çalışmada kullanılan bütün primerlerin polimorfik olduğu görülmüştür. Çalışmadan elde edilen PIC değerleri 0.322-0.921 arasında değişmiştir. Genetik kümeleneşinin görülmesi amaçlı oluşturulan dendrogramda populasyonlar dört grup altında toplanmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre, benzer yüksekliklerden toplanan populasyonların aynı grup içerisinde yer aldıkları görülmüştür. Bu durum toplanan örneklerdeki genetik çeşitliliğin coğrafi dağılım ile ilişkisini ortaya koymuştur. Çalışmada sonuç olarak, *Dactylis glomerata* ıslahı çalışmalarında gerekli materyali sağlamak açısından ülkemizde yeterince çeşitliliğin bulunduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Genetik farklılık, Mikrosatelit, Polimorfizm

## The Evaluation of Genetic Diversity in Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) Populations

### Abstract

Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) is a perennial forage grass, widely found in many regions of the world. Turkey is a rich country in terms of wild orchardgrass populations. This study was conducted in order to determine the genetic diversity of orchardgrass populations collected from eleven provinces of Turkey. Fourteen Simple Sequence Repeats (SSR) molecular markers were used to estimate genetic diversity in eleven populations. In the study, 72 alleles were detected. The mean number of alleles per locus was 5.14 and it was ranged between 2 and 12. In the study, all SSR loci were determined as polymorphic. The Polymorphism Information Content (PIC) values ranged between 0.322-0.921. A dendrogram was constructed in order to determine genetic cluster, it divided eleven populations into four groups. According to results, the population materials from the same altitude were in the same group thus showing a geographical distribution of genetic diversity of the populations. As a consequence of the study, it was observed that Turkey region have enough diversity to provide the necessary material in *Dactylis glomerata* breeding studies.

**Keywords:** Genetic difference, Microsatellit, Molymorphism

\*Sorumlu Yazar / Corresponding Author: gurkandemirkol@odu.edu.tr

## 1. Giriş

Günümüzde ve gelecekte yapılacak ıslah çalışmalarında sahip olunan doğal populasyonlar en önemli genetik materyallerdir. Bitkisel üretimde sürdürülebilirlik ancak bu materyallerin koruma altına alınmasıyla sağlanacaktır.

Ülkemizde yem bitkileri yetiştiriciliği gelişmiş ülkelere kıyasla oldukça geri kalmıştır. Bu durumun en önemli sebepleri; i) uygun çeşitlerin geliştirilememiş olması, ii) tohumluk probleminin giderilememiş olması, iii) yem bitkilerinin öneminin üretici tarafından tam anlamıyla bilinmemesi olarak sıralanabilir.

Yem bitkileri yetiştiriciliğinin ileri düzeyde olduğu Amerika, Avustralya ve Yeni Zelanda gibi ülkelerde çok önemli bir yere sahip olan domuz ayrığı (*Dactylis glomerata*) türü çok yıllık bir buğdaygil yem bitkisi olup ülkemizin hemen her yerinde doğal olarak bulunmasına rağmen yapılan çalışmalar oldukça yetersizdir.

Son zamanlarda biyoteknolojide görülen hızlı gelişmeler genetik kaynaklarda, genetik çeşitlilik, muhafaza, karakterizasyon, ıslah etme ve çeşit geliştirme gibi hususlar doğrultusunda çok önemli katkılar kazandırmıştır (Acunalp 2012).

Genetik çeşitlilik çalışmaları, genetik kaynakların muhafazası ve bunlardan yararlanılması hedeflerinin optimize edilmesinde gereklidir. Koruma sınırlı bir işlem olduğu için hangi genotiplerin korunacağı konusunda önceliğin belirlenmesi gerekmektedir. Çeşitlerin karakterize edilmesinde son yıllarda genellikle genomda herhangi bir gen bölgesi ile ilgili DNA parçasının temsil edilmesini sağlayan DNA moleküler markörleri kullanılmaya başlanmıştır (Mercan 2010).

Bu çalışma ülkemizin on bir farklı ilinden toplanan domuz ayrığı populasyonlarının genetik farklılıklarının belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Materyallerin toplanması

Çalışmada kullanılan domuz ayrığı populasyonları; Bolu (780 m), Bursa (302 m), Çanakkale (54 m), Gaziantep (965 m), Isparta (1243 m), İzmir (118 m), Kars (2028 m), Kırşehir (1016 m), Ordu (844 m), Rize (1024 m) ve Zonguldak (367 m) illerindeki belirtilen rakımlardan her ilden bir populasyon olacak şekilde toplanmıştır. Analizler öncesi ilgili örnekler yukarıda belirtilen duraklardan 20'şer adet bitki alınarak oluşturulmuştur.

#### 2.1.2. Bitki örneklerinde genomik DNA izolasyonu

Çiçeklenme döneminde toplanan materyallerde genomik DNA izolasyonu Lefort et al (1998) yöntemine göre yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA'ların, saflık değerleri ve

miktarları önce kontrol amaçlı agaroz jelde çalışılmış, daha sonra ise spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir.

### 2.1.3. Kullanılan SSR primerler

Çalışmada kullanılan primerler Çizelge 1’de verilmiştir. Kullanılan primerler daha önce kullanılan ve başarılı sonuçların alındığı primerlerdir (Xie et al 2012; Jiang et al 2013).

**Çizelge 1.** Çalışmada kullanılan primerlere ait bilgiler

Orijinal isim	Primer dizilişi (5'-3')	Orijinal isim	Primer dizilişi (5'-3')
A01F24	AAAATGTTTTATTCTCAGCCC TGCAAGATGGAATGCTCT	A03K22	AGACTCTAGGGTGGCACAC GTAGCACGCTAACGAGAGAT
A01H11	CATCGTAATGACTGCTAGTCC ACAGATCCATCGGTGGTT	A04C24	AGCAACATATCTTACTGCAATG ATCAAACCTCGAAAAGTTGTCA
A01K14	AAGGATGGCCTGATCTTC GCAGAGGTCTTCTCTTGG	A04O08	AGAGGTTAGATGGATGTAGGC ATAGACCCATAGCATGTTGG
A02A10	AGGTTACCGATAGTAAGTGGG AGGGGATGGTTGGTTAGTAT	A01E14	ACCCGTTTTCTATCTCCAG GTTCTAGCGTCGTGAGGG
A02J20	TCCAATGTTACACACATAGCA TGTGTGCGATTTCTGTG	B01A05	GAGAGCGGCAGAGTTATTC AAAGGTCGATATCTCTATTCCA
A03B16	TCTGGAATCTCTGAAATCA ATCTTGACCCTGATGTTCTG	B01C15	GTCGATTGATGGTGTACGTA TCTAGTGCTACTTGTATGCACC
A03C05	TAAGAATCGATCCTCCCG ACCTTCTCCACTCCGTC	B01E09	ACAACCTACAAACTCAAGAACA GTGGACTCGGAGGAGAAG

### 2.1.4. SSR allel bölgelerinin PCR ile çoğaltılması

Çalışma için optimize edilmiş PCR koşullarına ait reaktiflerin yoğunluk ve miktarları Çizelge 2’de, sıcaklık döngüsel düzeni ise Çizelge 3’te verilmiştir.

**Çizelge 2.** Çalışma için optimize edilmiş PCR koşullarına ait reaktiflerin yoğunluk ve miktarları

Reaktif	Yoğunluk	Miktar
Genomik DNA	100 ng/µl	1 µl
İleri primer	2.5 pmol	1 µl
Geri primer	2.5 pmol	1 µl
ddH <sub>2</sub> O		17 µl

**Çizelge 3.** PCR sıcaklık döngüsel düzeni

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Ön denatürasyon	95	5 dk	1
Denatürasyon	95	30 sn	
Bağlanma	57	30 sn	35
Uzama	72	30 sn	
Son uzama	72	5 dk	1
Saklama	4	∞	

### 2.1.5. Agaroz jel elektroforez yöntemi ile ayırılmanın sağlanması ve skorlama

Lokuslara ait PCR ürünleri % 2.5'lik agaroz jel elektroforezinde 60V 300A şartlarında 6 saat koşturulmuştur. Bant ağırlıklarının tahmini için 100 bp DNA ladder kullanılmıştır. Elde edilen jel görüntüleri sonrasında skorlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

### 2.1.6. Kümeleme analizi

Çalışmada, NTSYSpc v2.11 programı ile UPGMA yöntemine göre populasyonların kümeleme analizleri yapılmış ve dendrogramları çıkarılmıştır.

## 3. Bulgular ve Tartışma

Çizelge 4 incelendiğinde çalışma sonucunda toplam 72 allel tespit edilmiş olup, lokus başına ortalama allel sayısı 5.14 olarak bulunmuştur. Çalışmada en çok allel gösteren mikrosatelit lokusu 12 allel ile A01E14 primerinde görülürken, en az allel gösteren lokus 2 allel ile A02J20 ve B01C15 primerlerinde görülmüştür (Çizelge 4). Çalışmada kullanılan bütün primerlerin polimorfik özellik gösterdikleri tespit edilmiştir.

Çalışmada en yüksek PIC değeri 0.921 ile A01E14 kodlu primerde bulunurken, en düşük PIC değeri ise 0.322 ile A02J20 kodlu primerde bulunmuştur (Çizelge 4).

Benzer primerlerin kullanıldığı bilimsel araştırmalarda görülen değerler mevcut çalışma verileri yüksek oranda benzerlik göstermektedir (Hirata et al 2011; Xie et al 2012; Jiang et al 2013; Madesis et al 2014; Xie et al 2014; Zhao et al 2014).

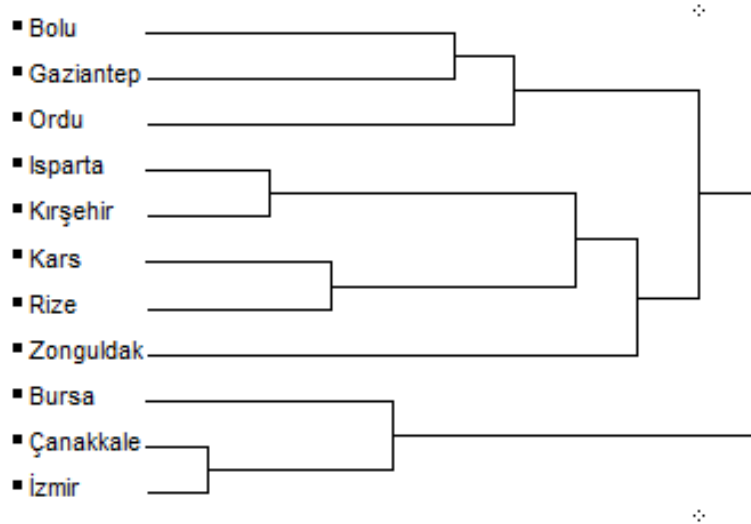
Yapılmış çalışmalarda örneklerin toplandığı bölgenin büyüklüğüne paralel olarak genetik farklılığın artmış olduğu görülmektedir. Mevcut araştırmada, örneklerin toplanmış olduğu bölge göz önüne alınacak olursa, neredeyse tüm Avrupa ülkelerinden toplanan

**Çizelge 4.** Çalışmada kullanılan primerlerin PIC değerleri ve allel sayıları

Primer adı	PIC değeri	Allel sayısı
A01F24	0.771	4
A01H11	0.705	4
A01K14	0.892	6
A02A10	0.731	4
A02J20	0.322	2
A03B16	0.757	4
A03C05	0.903	9
A03K22	0.877	6
A04C24	0.698	4
A04O08	0.564	3
A01E14	0.921	12
B01A05	0.722	5
B01C15	0.455	2
B01E09	0.843	7

örnekler ile yürütülen araştırmalarda elde edildiği kadar çeşitlilik tespit edilmiş olması ülkemizin domuz ayırığı açısından çok zengin bir genetik havuza sahip olduğunu göstermektedir. Bu durum, yem bitkileri üretimi açısından diğer Avrupa ülkelerinin gerisinde kalmış olan ve yerel tohum problemi yaşayan ülkemiz için oldukça kayda değer bir bulgu olarak dikkat çekmektedir. Hirata et al (2011) domuz ayırığı türü üzerinde yapmış olduğu araştırmada bu zenginliğin ıslah anlamında çok büyük avantajlar oluşturacağına dikkat çekmiştir.

UPGMA yöntemi kullanılarak elde edilen filogenetik dendrogram incelendiğinde populasyonların dört grup altında toplandıkları görülmektedir. İlk grupta 750-1000 m yükseklik aralığından toplanan Bolu, Gaziantep ve Ordu populasyonları içerisinde en çok populasyonu barındıran ikinci grupta 1000 m üzeri yükseklikten toplanan Isparta, Kırşehir, Kars, Rize populasyonları, üçüncü grupta yalnızca Zonguldak populasyonu, dördüncü grupta ise birbirine yakın coğrafi bölgede sayılabilecek olan Bursa, Çanakkale ve İzmir populasyonları yer almıştır (Şekil 1). İlk iki grupta rakım seviyeleri bakımından



Şekil 1. UPGMA yöntemi kullanılarak elde edilen filogenetik dendrogram

dördüncü grupta ise benzer coğrafi bölge bakımından anlamlı sonuçlar elde edilmiş olması yapılan analizlerin güvenilirliğini ortaya koymakla birlikte aynı zamanda ülkemizdeki genetik çeşitliliğin birçok faktör açısından değişiklik gösterebildiğini izah etmektedir.

#### 4. Sonuç

Çalışmada toplanan *Dactylis glomerata* populasyonlarının genetik karakterizasyonu bu konuda en güvenilir moleküler analizlerden biri olan mikrosatelitler ile ortaya konmuştur. Araştırmada yüksek oranda çeşitlilik tespit edilmiştir. Bu durum önümüzdeki yıllarda sürdürülebilecek ıslah çalışmaları için ülkemizde bulunan mevcut materyalden faydalanılabileceğini göstermektedir.

## Kaynakça

1. Acunalp S (2012). Ekonomik öneme sahip yerli kiraz (*Prunus avium* L.) genotiplerinin SSRs (Simple Sequence Repeats)'a dayalı genetik karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
2. Hirata M, Yuyama N & Cai H (2011). Isolation and characterization of simple sequence repeat markers for the tetraploid forage grass *Dactylis glomerata*. *Plant breeding*, **130**(4): 503-506.
3. Jiang L F, Zhang X Q, Ma X, Huang L K, Xie W G, Ma Y M & Zhao Y F (2013). Identification of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) cultivars by using simple sequence repeat markers. *Genetics and molecular research* **12**(4): 5111-5123.
4. Lefort, F., Lally, M., Thompson, D., Douglas, G.C. 1998. Morfolojical traits microsatellite fingerprinting and genetic relatedness of a stand of elite oaks (Q. Robur L.) at Tuallynally, Ireland. *Silvae Genetica* **47**: 5-6.
5. Madesis P, Abraham E M, Kalivas A, Ganopoulos I & Tsafaris A (2014). Genetic diversity and structure of natural *Dactylis glomerata* L. populations revealed by morphological and microsatellite-based (SSR/ISSR) markers. *Genetics and molecular research* **13**(2): 4226-4240.
6. Mercan L (2010). Yerli tavuk genotiplerinin ticari genotipler ile olan genetik farklılığının SSR (Simple Sequence Repeats- Basit Dizi Tekrarları) yöntemi ile analizi. Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Zootekni Anabilim Dalı, Samsun.
7. Xie W, Bushman B S, Ma Y, West M S, Robins J G, Michaels L & Stratton S D (2014). Genetic diversity and variation in North American orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) cultivars and breeding lines. *Grassland science* **60**(3): 185-193.
8. Xie W G, Lu X F, Zhang X Q, Huang L K & Cheng L (2012). Genetic variation and comparison of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) cultivars and wild accessions as revealed by SSR markers. *Genetics and molecular research* **11**: 425-433.
9. Zhao Y F, Zhang X Q, Ma X, Xie W G & Huang L K (2014). Morphological and genetic characteristics of hybrid combinations of *Dactylis glomerata*. *Genetics and Molecular Research* **13**(2): 2491-2503.