

PCR METODU İLE KENDİLENMİŞ MISIR HATLARINDA (S₄) GENETİK UZAKLIĞIN BELİRLENMESİ

Bülent SAMANCI*,

Leyla AÇIK**

ÖZET

Samsun, Elazığ ve Bolu yöresinden elde edilen F₂ mısır populasyonları 1992 yılında kendilenmiştir. Kendileme işlemleri 1996 yılına kadar devam ettirilmiş ve S₄ generasyonuna ait 20 mısır hattı örneği heterotik melezlerin önceden tahmini için 1997 yılında PCR çalışmaları için kullanılmıştır. Elde edilen DNA bantlarından genetik uzaklıklar (D) hesaplanmış ve alınan bu değerlere cluster analizi uygulanarak dendogram grafikleri çıkarılmıştır. I. grupta 195. ve 110., II. grupta 226. ve 238. ve III. grupta 302. ve 520-2. hat birbirlerinden genetik bakımdan en uzak hatlar olarak belirlenmiştir. Bunlar arasında yapılacak olan melezlemeler sonucu elde edilecek F₁ melezlerinin heterosis göstereceği beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler : PCR metodu, kendilenmiş mısır hatları, genetik çalışmalar.

ABSTRACT

THE DETERMINATION OF GENETICAL DISTANCE IN SELFED MAIZE LINES (S₄) BY USING PCR ANALYSIS

Selfings were done in F₂ populations in 1992 among plants collected from Samsun and Elazığ and Bolu. Selfings were done up to the year of 1996 and 20 maize line samples belongs to S₄ generation were used in PCR analysis in 1997 to predict the heterotic hybrids. Genetical distances (D) were calculated from DNA bands and cluster analysis was done to generate dendogram graphics. The highest genetical distances were obtained in lines between 195. and 110. in group I and 226. ve 238. in group II and 302. and 520-2. in group III. It is expected that F₁ hybrids would show heterosis as a result of crossing among these lines.

Key Words : PCR method, inbred corn lines, genetical studies.

GİRİŞ

Mısır ıslahında kendilenmiş hatlarından hangilerinin heterosis gösterebileceğini önceden tahmin etmek gerekmektedir. Elde edilen saf hatlar arasında genel ve özel uyuma yeteneklerinin saptanması için melezlemeler yapılması ve elde edilen melez çeşitlerin arazide test edilmesi genel olarak uygulanan bir yöntemdir. Fakat bu yöntem daha fazla zaman harcanmasını ve masraf yapılmasını gerektirmektedir. Bu nedenle melezlemeleri en az düzeye indirmek ve hibrid kombinasyonuna

* Yrd. Doç. Dr., Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, ANTALYA

** Yrd. Doç. Dr., Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, ANKARA

PCR Metodu İle Kendilenmiş Mısır Hatlarında (S₄) Genetik Uzaklığın Belirlenmesi

girecek hatları önceden belirlemek bu olumsuzlukları giderecektir. Son yıllarda moleküler biyoloji teknikleri seleksiyonda daha etkili olabilmek için kullanılmakta ve bu teknikler de protein DNA polimorfizmi üzerine kurulmaktadır.

Kendilenmiş mısır hatlarında hibrid verimliliğini belirleyebilmek için önceleri protein izozimleri kullanılmıştır (Hunter ve Kannenberg, 1971; Gonella ve Paterson, 1978; Frei ve ark., 1986). Bu araştırma sonuçlarına göre verim için genel uyuma yeteneği ile heterozigot olan izozim lokusları arasında pozitif korelasyon bulunmasına rağmen özel kombinasyon yeteneği arasında bulunamamıştır. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)'nin izozim çalışmalarından daha avantajlı olduğu bildirilmiştir (Smith ve ark., 1990). İzozimlere göre RFLP'nin daha fazla polimorfizm ve genomun değişik bölgelerinde bulunması bu metodun üstünlükleri olarak bilinmektedir. RFLP farklılıklarının hibrid verimliliği ile ilişkisini belirleyebilmek için yapılan bu çalışmalarda verimlilik ile RFLP lokusları arasında korelasyon bulunmamasına rağmen, kendilenmiş hatlar arasında heterotik grupların belirlenmesi sağlanabilmiştir.

PCR (Polymerase Chain Reaction) teknikleri belirli DNA segmentlerinin çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Bu da enzimatik olarak belirli bir DNA zincirinin karşıtı olan primerlerden yararlanılarak gerçekleştirilir. PCR tekniğinde çok düşük oranda DNA miktarına gereksinim duyulması (100 mg-1 µg) bu tekniğin başlıca üstünlüğünü oluşturmaktadır. PCR marker olarak filogenetik ilişkilerde kullanıldığı gibi, çeşit belirlenmesinde ve açılım gösteren popülasyonlarda genotipik varyasyonun belirlenmesinde de kullanılmaktadır (Welsh ve ark., 1991; Rom ve ark., 1995; Cheep ve ark., 1991). Bu çalışmanın amacı, kendilenmiş (S₄) 20 mısır hattunda genetik uzaklıkların PCR analizi ile tahmin edilmesi ve heterotik melezleri önceden belirlenmesi olmuştur.

MATERYAL VE METOD

Bitki Materyali

Bu çalışmada kullanılan kendilenmiş 20 S₄ mısır hattı Adana'da 1992 yılında başlatılan ıslah çalışmalarından elde edilmiştir. Bu çalışmalarda açıktan dölenen F₂ mısır popülasyonları değişik illerden (Bolu, Samsun ve Elazığ) temin edilmiştir. Kendileme işlemi 1992, 1993, 1994, 1995 ve 1996 yıllarında yapılmış ve 1997 yılında elde edilen S₄ generasyonundan yaprak örnekleri alınarak DNA ızalasyonu için kullanılmıştır. DNA ızalasyonu ve PCR reaksiyonları Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü olanakları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

DNA Ekstraksiyonu

1997 yılında 20 farklı pedigraye sahip S₄ generasyonuna ait mısır tohum örnekleri içinde turf ve perlit karışımı bulunan violer içinde çimlendirilmiş ve bitki büyütme odasında gelişmeye bırakılmıştır. Bitkiler 4 yapraklı olunca yaprak

örnekleri sıvı nitrojende ezilmiş ve DNA izole edilmiş ve RAPD reaksiyonları gerçekleştirilmiştir (Açık ve ark., 1997). Reaksiyonlar 20 mM Tris-HCl, 0.8 % nonident P40, 25 mM MgCl₂, 100 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0.2 µM primer, 25 ng mısır genomik DNA ve 1 U Taq polimeraz ile gerçekleştirilmiştir. Amplifiye olmuş DNA parçacıkları 1 X TAE buffer içeren % 1.9'luk agaros gel elektforezi ile ayrıştırılmış ve 20 µl hacimlik örnek gel üzerine yüklenmiş ve ethidium bromide ile boyanmıştır. Ortaya çıkan DNA bantlarının fotoğrafları çekilmiştir.

Veri Analizi

Her bir örnekteki DNA bantları kaydedilmiş ve bunlar birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Kendilenmiş hatlar arasındaki varyasyon benzerlik olarak "S" belirlenmiş ve $S = 2 \times N_{AB} / N_A + N_B$ olarak formüle edilmiştir (Wolf ve Rijn, 1993). N_{AB}, A ve B kendilenmiş hatlar arasındaki ortak bant sayısı, N_A ve N_B ise A ve B kendilenmiş hatlarının göstermiş oldukları bant sayısı olarak alınmıştır. Benzerlik ölçüsü (S) aynı zamanda ortak bant oranı olarak da söylenebilir. Genetik uzaklık D harfi ile gösterilmekte ve $D = 1 - S$ olarak formüle edilmektedir. Ortak bant analizi, kendilenmiş hatlar arasında karşılaştırma yapmada, genetik uzaklıkları belirleme ve dendogram grafiklerini çıkarmada SPSS bilgisayar programından yararlanılmıştır.

ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Genetik uzaklıkları belirlemek için kullanılan kendilenmiş 20 mısır hattı (S₄) 3 gruba ayrılarak Tablo 1'de verilmiştir. Bu hatlardan alınan örneklerden izole edilen DNA ve yürütülen PCR çalışması sonucunda amplifiye edilmiş polimorfik DNA bantları Materyal ve Metod'ta belirtildiği gibi genetik uzaklıkların hesaplanması için kullanılmış ve hatlar arasındaki bu uzaklıklar (D) Tablo 2, 3 ve 4'te verilmiştir. Hatlar arasındaki genetik uzaklık değerleri 0 ve 1 arasında değişim göstermiştir. 0 değeri hatlar arasında genomik farklılıkların olmadığını belirtmektedir. 30. hat I. grupta 110., 194., 195. ve 196-2. hatlarla genetik olarak benzer oldukları

Tablo 1. PCR Analizinde Kullanılan 20 Kendilenmiş (S₄) Mısır Hattının Elde Edildiği Pedigri'ler ve Orjinler

Pedigri	I		II		III	
	Orjin	Pedigri	Orjin	Pedigri	Orjin	Pedigri
312	Samsun	224	Samsun	302	Elazığ	
80	Samsun	226	Samsun	316	Bolu	
110	Samsun	233	Elazığ	390	Bolu	
190-2	Samsun	238	Elazığ	400	Bolu	
194	Samsun	256	Elazığ	520-2	Bolu	
195	Samsun	288	Elazığ	568	Bolu	
196-2	Samsun			651	Bolu	

PCR Metodu İle Kendilenmiş Mısır Hatlarında (S₄) Genetik Uzaklığın Belirlenmesi

Tablo 2. 312, 80, 110, 190-2, 194, 195 ve 196-2 Olarak Kodlanan Kendilenmiş Mısır (S₄) Hatlarının Genetik Uzaklık (D) Değerleri

	312	80	110	190-2	194	195	196-2
312	0						
80	0	0					
110	1	0	0				
190-2	0.33	0.33	1	0			
194	0	0	1	0.33	0		
195	1	0	1	0.33	0	0	
196-2	1	0	1	0.33	0	0	0

Tablo 3. 224, 226, 233, 238, 256 ve 288 Olarak Kodlanan Kendilenmiş Mısır (S₄) Hatlarının Genetik Uzaklık (D) Değerleri

	224	226	233	238	256	288
224	0					
226	0.60	0				
233	0.50	0.14	0			
238	1	1	1	0		
256	0.33	0.33	0.20	1	0	
288	0.50	0.43	0.33	1	0.20	0

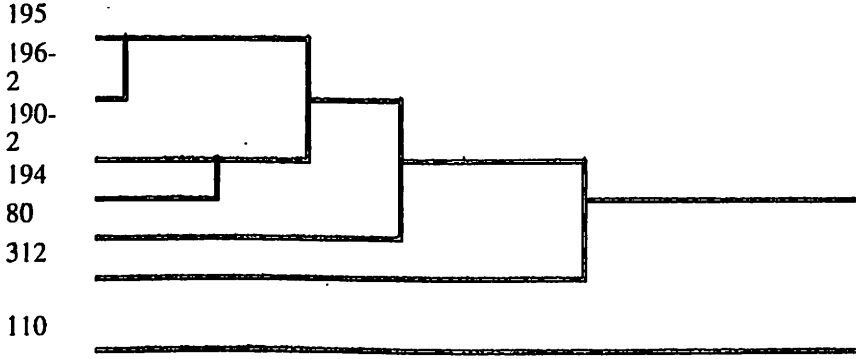
Tablo 4. 302, 316, 390, 400, 520-2, 568 ve 651 Olarak Kodlanan Kendilenmiş Mısır (S₄) Hatlarının Genetik Uzaklık (D) Değerleri

	302	316	390	400	520-2	568	651
302	0						
316	0	0					
390	0.50	0.50	0				
400	0.50	0.50	0	0			
520-2	1	1	1	1	0		
568	0.60	0.60	0.33	1	1	0	
651	0.50	0.50	0	1	1	0.33	0

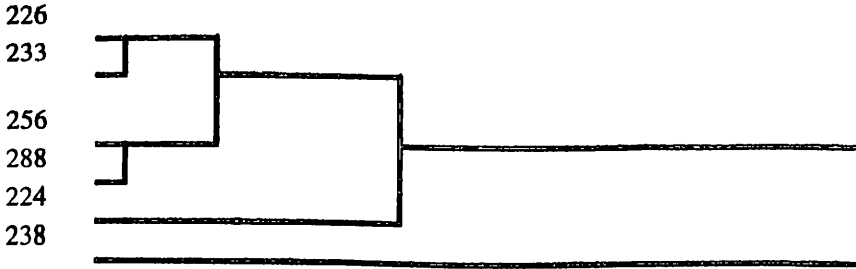
görülmüştür. Bu sonuç hatların elde edildiği populasyonda yeterli varyasyonun olmadığı izlenimini vermektedir.

Elde edilen bu verilerden genetik ilişkileri daha belirgin bir şekilde ortaya

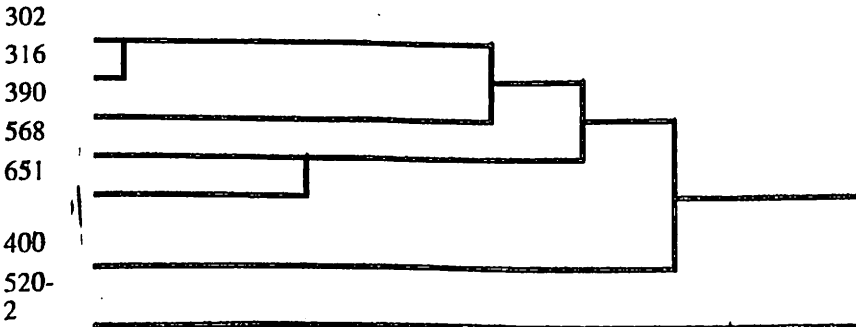
koyabilmek için dendogram grafikleri SPSS bilgisayar programı yardımı ile çizilmiş ve Şekil 1 a, b ve c'de gösterilmiştir. I. grupta 195. ve 110. hat, II. grupta 226. ve 238. hat ve III. grupta 302. ve 520-2 hat birbirlerinden en uzak olan hatlar olarak belir-



(a)



(b)



(c)

Şekil 1. Tablo 2, 3 ve 4'te verilen genetik uzaklık değerleri kullanılarak I. grup (a), II. grup (b) ve III. grup (c) S4 mısır hatlarına ait dendogramlar. Uzunluklar hatlar arasında genetik farklılıkları belirtmektedir.

PCR Metodu İle Kendilenmiş Mısır Hatlarında (S₄) Genetik Uzaklığın Belirlenmesi

lenmiştir. Alınan bu sonuçlara göre bu hatlar arasında yapılacak olan melezlemelerden elde edilen hibrid döllerin heterosis gösterme olasılığının daha yüksek olabileceği ve daha verimli olabilecekleri ifade edilebilir. Çünkü, heterosis genetik bakımından uzak olan bireyler arasında ortaya çıkmakta ve bu sonuç bazı araştırmacılar tarafından da belirtilmektedir (Smith ve ark., 1990; Godhalk ve ark., 1990). Bu nedenle bu çalışmanın devamı olarak 1988 yılında bu hatlar arasında melezlemeler yapılacak ve hibrid verimlilikleri 1999 yılında araştırılacaktır.

PCR sonuçlarına göre cluster analizi yapılarak ortaya çıkarılan dendrogram grafikleri yardımı ile bireyleri heterotik gruplara ayırmak mümkün olmaktadır. Genel olarak hibrid kombinasyonuna giren saf hatların sayısı azdır ve yüksek performans gösterecek melezlerin ortaya çıkarılması bir melez ıslahı programının başlıca amacıdır. Yapılan bir çalışmaya göre (Halluer, 1990) 1938 yılından bu yana 720.000 saf hat geliştirilmiş ve bunların sadece % 1'i hibrid kombinasyonunda kullanılabilmiştir. Bu nedenle hibrid kombinasyonuna girmeyen saf hatların önceden elenmesi zaman kaybını önleyecek ve tohumluk maliyetini düşürecektir. Bu sayının düşürülmesi geçmişte olmayan fakat son zamanlarda kullanılan PCR metodu gibi "moleküler genetik teknikleri" yardımcı olabilecektir.

KAYNAKLAR

- Açık, L., B. Samancı, H. Duman and F. Unal., 1997. Polymorphism and Phylogenetic Relations Among Turkish Species In The Genus *Stenbergia* as Determined RAPD-PCR. *Turkish Jour. of Botany*. 21 : 265-268.
- Cheep, P.P., R. Drong and J.L., Slightom, 1991. Using Polymerase Chain Reaction to Identify Transgenic Plants. *Plant Mol. Biology Manual*. 1-28.
- Frel, O.M., C.W., Stuber, and M.M. Goodman, 1986. Use of Allozymes as Genetic Markers For Predicting Performance in Maize Single Cross Hybrids. *Crop Sci*. 26 : 37-42.
- Godhalk, E.B., M., Lee, and K.R., Lamkey, 1990. Analysis of Relationship of RFLP to Maize Single Cross Hybrid Performance. *Theor. Appl. Genet*. 80 : 169-187.
- Gonella, J.A. and P.A. Peterson, 1978. Isozyme Relatedness of Inbred Lines of Maize and Performance of Their Hybrids. *Maydica*. 23 : 55-61.
- Halluer, A.R., 1990. Methods Used in Developing Maize Inbreds. *Maydica*. 35 : 1-16.
- Hunter, R.B. and L.W., Kannenberg, 1971. Isozyme Characterization of Corn (*Zea mays L.*) Inbreds and Its Relationship to Single Cross Hybrid Performance. *Can. J. Genet. Cytol*. 13 : 649-655.
- Melchinger, A.E., M.M., Messmer, M., Lee and K.R., Lamkey, 1991. Diversity and Relationships Among US Maize Inbreds Revealed by RFLP. *Crop Sci*. 31 : 669-678.

- Rom, M., M. Bar, M. Plowsky, and D., Gidoni, 1995. Purity Control of F₁ Hybrid Tomato Cultivars by RAPD Markers. *Plant Breeding*. 114 : 188-190.
- Smith, O.S., J.S.C., Smith, S.L., Bowen, R.A. Tenborg, and S.J., Wall, 1990. Similarities Among a Group of Elite Inbreds as Measured by Pedigree, F₁ Grain Yield, Heterosis and RFLP's. *Theor. Appl. Genet.* 80 : 833-840.
- Welsh, J.R.J., Honeycutt, M., McClelland, and B.W.S. Sobral, 1991. Parentage Determination in Maize Hybrids Using The Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction. *Theor. Appl. Genet.* 82 : 473-476.
- Wolf, K. and J.P., Rijn, 1993. Rapid Detection of Genetic Variability in *Chrysanthemum* Using Random Primers. *Heredity*. 71 : 335-341.