

Yeni Nesil Sekanslama Teknolojisi Kullanılarak Antepfıstığı Genomunun Taranması ve Cinsiyet İle İlişkili Markörlerin Belirlenmesi

¹Salih Kafkas, ¹Mortaza Khodaeiaminjan, ¹Murat Güney, ²Nergiz Çoban, ¹Elmira Ziya Motalebipour, ²Hatice Gozel, ¹Hayat Topçu, ¹Ebru Kafkas

¹Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, 01330, Adana

²Antepfıstığı Araştırma İstasyonu Müdürlüğü, Gaziantep

e-posta: skafkas@cu.edu.tr

Özet

Antepfıstığı ülkemizin en önemli sert kabuklu meyve türlerinden biridir. Dünyada antepfıstığı yetiştiriciliğinin sınırlı sayıda olması bu tür üzerine yapılan genetik çalışmaların da sınırlı sayıda kalmasına neden olmuştur. Bu nedenle, literatürde antepfıstığının genom yapısı hakkında bilgi yok denecek kadar azdır. Yapılan bu çalışmada antepfıstığının genom yapısının ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, antepfıstığının 26.7 Gb miktarındaki dizisi İllumina yeni nesil sekanslama cihazından elde edilmiştir. Sonuç olarak, antepfıstığının %37 GC ve yüksek heterozigoti oranına sahip olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında, antepfıstığının dioik çiçek yapısına sahip olması ve gençlik kısırlığı döneminin uzun olması nedeniyle ıslah programları hem maliyetli olmakta hem de uzun zaman almaktadır. Bu çalışmada ıslah programında erken seleksiyon yapabilmek için yeni nesil sekanslama teknolojisi kullanılarak SNP cinsiyet markörlerinin de geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla kesilen bölge ilişkili DNA sekanslama (RAD-seq) teknolojisi kullanılmıştır. Sonuç olarak, antepfıstığında ıslah programlarında erken seleksiyon için cinsiyet markörleri geliştirilmiş ve antepfıstığının ZW/ZZ cinsiyet belirleme sistemine sahip olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antepfıstığı, yeni nesil sekanslama, cinsiyet, genom

Genome Survey and Identification of Sex-Linked Markers in Pistachio by Next-Generation Sequencing

Abstract

Pistachio is one of the most important nut crops in Turkey. There are very limited number of genetic studies in pistachio due to a limited number of pistachio producer countries in the world. Therefore, there is no adequate genetic information about pistachio genome. It was aimed to get genetic information about pistachio genome in this study. So, 26.7 Gb data was obtained from illumina next generation sequencer. As a result, pistachio had about 37% GC rate and high heterozygosity. Moreover, cultivar breeding programs in pistachio take too long time due to dioecious character and long juvenility period. Therefore, we aimed to develop sex-linked SNP markers using next generation technology for marker-assisted selection. RAD (Restriction-site associated DNA) sequencing technology was used to find sex-linked markers in pistachio. As a result, we develop SNP sex-linked markers and determined ZW/ZZ sex determination system in pistachio.

Keywords: Pistachio, next-generation sequencing, sex, genome

Giriş

Ülkemiz antepfıstığının anavatanlarından biridir ve ülkemizde uzun yıllardır antepfıstığı yetiştiriciliği yapılmaktadır. Antepfıstığında bugüne kadar yetiştiricilikte kullanılan çeşitler daha çok doğal seleksiyonla ortaya çıkmıştır. Melezleme yoluyla antepfıstığı çeşit ıslahı üzerine ABD, Türkiye ile İspanya'da çalışmalar devam etmektedir (Kafkas, 2006). Antepfıstığının dioik çiçek yapısına sahip olması ve gençlik kısırlığı döneminin çok uzun olması nedeniyle ıslah çalışmaları oldukça uzun yıllar almaktadır. Ülkemizde ise melezleme yoluyla çeşit ıslahı çalışmaları 1995 yılında Antepfıstığı Araştırma İstasyonu'nda, 2002 yılında Çukurova Üniversitesi'nde başlatılmış ve halen devam etmektedir (Kafkas ve ark., 2005; Uzun ve ark., 2011). Dioik bitki türlerinde özellikle meyve ile

ilgili karakterler çalışıldığında önemli zorluklar ile karşı karşıya kalınmaktadır. Çünkü tozlayıcı bitki meyve üretmediği için meyve özellikleri bakımından tozlayıcıyı seçme şansı bulunmamaktadır. Bu zorlukların ancak günümüz teknolojisini kullanarak üstesinden gelebilmek mümkündür. Bu da moleküler markör tekniklerinden, moleküler ıslahat yararlanmakla mümkün olabilir. Antepfıstığında değişik meyve özellikleri ile ilgili (meyve iriliği, çitlama, iç randımanı gibi) markörlerin belirlenmesi durumunda antepfıstığında ıslah süresini kısaltmak ve ıslah programında daha fazla bitki ile çalışabilmek mümkün olacaktır. Böylece verim ve meyve özellikleri mevcut çeşitlerden daha iyi olan çeşitleri ıslah etme şansı artmış olacaktır.

Günümüzde yeni nesil sekanslama teknolojisinin gelişmesiyle ve sekanslamanın hergün biraz daha ucuzlaması nedeniyle birçok türde tüm genomun sekanslaması ile ilgili projelerin sayısı giderek artmaktadır. Ancak literatür incelendiğinde antepfıstığının genom yapısı hakkında fazla bilgi olmadığı gibi fazla sayıda sekans bilgisi de bulunmamaktadır. Özellikle bir türün tüm genom sekansını elde etmek için yapılacak bir çalışmada oluşturulacak kütüphaneye tipleri ile büyüklükleri ve bunların sekanslama yoğunluklarına karar vermek için yani izlenecek sekanslama stratejisini belirlemek için öncelikle genom yapısıyla ilgili heterozigotluk oranı, tekrar dizilerinin durumu ve GC içeriği gibi bazı bilgilere gereksinim vardır. Literatürde maalesef antepfıstığının genom yapısıyla ilgili neredeyse hiçbir bilgi yoktur. Tüm genom sekanslama projelerinde sekansların iyi ve doğru bir şekilde birleştirilebilmesi (assembly) için uygun kütüphanelerin oluşturulması ve bunların yeterli yoğunlukta sekanslamanın yapılması gerekir. İşte bu sekanslama stratejisine ve buna göre ortaya çıkacak maliyete karar verebilmek için de o türün genomunun yapısıyla ilgili ön bilgilere gereksinim vardır. Bu nedenle, çalışmanın birinci amacı yeni nesil sekanslama teknolojisini kullanarak antepfıstığı genomunun yapısı ile ilgili ön bilgileri ortaya çıkarmaktır. Böylece buradan elde edilen verilerin öncülüğünde antepfıstığının tüm genom sekansının elde edilmesine yönelik araştırmalara başlanabilecektir. Antepfıstığının tüm genom sekansının ileride elde edilmesi ile birlikte iyi derecede doymuş genetik haritalar ile entegrasyonu gerçekleştirilerek fiziksel haritalar da oluşturulabilecektir.

Literatürde bugüne kadar *P. vera*'da Hormaza ve ark. (1994) tarafından RAPD tekniği kullanılarak geliştirilen bir adet dişiye özgü RAPD cinsiyet markörü vardır. Bu RAPD marköründen daha sonra spesifik SCAR primerler Yakubov ve ark. (2005) tarafından dizayn edilmiş ve en son olarak Esfandiari ve ark. (2012) bu markörün yabancı *Pistacia* türlerinde de çalıştığını bildirmiştir. Ancak laboratuvarımızda bu SCAR primeri ile ilgili yapılan analizlerde geliştirilen bu dişiye özgü cinsiyet markörün erkek bireylerde de görüldüğü ve bunun ötesinde yabancı türlerde ise hiçbir şekilde ayırım yapmadığı ve markörün hem dişi hem de erkek bireylerde bulunduğu belirlenmiştir. Bu durum ayrıca cinsiyeti belli F1

populasyonunda da test edilmiş ve bu markörün istenilen şekilde çalışmadığı ve yüksek hata oranına sahip olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, antepfıstığında %100 doğrulukla çalışan cinsiyet markörü veya markörlerinin geliştirilmesi oldukça önemlidir. İşte bu çalışmanın ikinci amacı da antepfıstığında hatasız çalışan cinsiyet markörleri geliştirmektir.

Materyal ve Yöntem

Bitki Materyali ve DNA İzolasyonu

Bu çalışma kapsamında, Siirt x Bağyolu F1 populasyonuna ait F1 bitkileri ile ebeveynler materyal olarak kullanılmıştır. Ayrıca cinsiyet ile ilişkili primerleri test etmek için *P. atlantica*, *P. eurycarpa*, *P. terebinthus*, ve *P. integerrima* türlerinden 10 dişi ve 10 erkek bitki de kullanılmıştır. Ebeveyn ve F1 bitkiler ise yabancı *Pistacia* türlerinden DNA izolasyonu Doyle ve Doyle (1987)'nin geliştirdiği Kafkas ve ark. (2006) tarafından modifiye edilen CTAB yöntemi kullanılarak yapılmıştır. İzolasyonu sonrası ise stok DNA'lar SNP analizleri için 5 ng/µl konsantrasyonuna ayarlanmıştır.

Yeni Nesil Sekanslama

Antepfıstığında cinsiyet markörleri geliştirmek için 8 dişi ve 8 erkek F1 bitkisi ile ebeveynler RAD (Restriction site associated DNA) sekanslaması için kullanılmıştır. Bunların ötesinde, antepfıstığı genomunun özelliklerini belirlemek için ise Siirt çeşidi DNA'sı da sekanslanmıştır. Siirt çeşidinin sekanslanması sonucu elde edilen dizilerde genomun heterozigotluk oranı, %GC içeriği ve tahmini genom büyüklüğü belirlenmiştir. Tüm sekanslamalar İllumina Hi-seq 2000 cihazında yapılmıştır.

SNP Analizleri

RAD sekanslama sonucunda bulunan cinsiyet ile ilişkili aday SNP lokuslarının analizi öncelikle SNaPshot mini sekanslama yöntemi ile cinsiyeti belli 42 adet F1 bitkisi ile doğrulanmıştır. F1 bitkilerde doğru ayırım yaptıkları belirlenenler Kafkas ve ark. (2006) tarafından daha önce karakterizasyonu yapılan 17 erkek ve 47 dişi antepfıstığı çeşidinde test edilmiştir. Yapılan bu analizler sonucu cinsiyeti doğru olarak ayıran markörlerin ıslah programlarında kullanılabilirliği daha düşük maliyetli olması ve hızlı sonuç vermesi nedeniyle Real-Time PCR cihazında HRM yöntemi ile test edilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Antepfıstığı Genomunun Yapısı

Antepfıstığının tüm genomunun sekansına başlamadan önce genom yapısını ortaya koymak için Siirt çeşidi DNA'sı kullanılarak 250 bp ve 500'lik 2 adet kütüphane oluşturulmuş ve çift yönlü (Pair end; PE) olarak İllumina Hi-seq 2000 cihazında 150 bp uzunluğunda (PE150) sekanslaması yapılmıştır. Bu sekanslamalardan toplam 26.77 Gb dizi elde edilmiştir. Dizilerin birleştirme işleminden sonra K-mer analizleri yapılarak antepfıstığının genom büyüklüğü ve heterozigotluk seviyesi belirlenmiştir. K-mer frekansı ile K-mer derinliği arasındaki ilişkiyi gösteren grafik Şekil 1'de gösterilmiştir. K değeri 17 olarak alınmış ve toplam 16.684.162.450 adet K-mer elde edilmiştir. Bu değerin K-mer derinliğine (28) bölünmesiyle antepfıstığının tahmini olarak 600 Mb civarında bir genom büyüklüğüne sahip olduğu belirlenmiştir. Antepfıstığı genomunun 600Mb olduğu düşünüldüğünde, K-mer analizlerinin 44x yoğunluğunda bir dizi ile yapıldığı ortaya çıkmaktadır. Aynı zamanda bu analiz ile antepfıstığının tekrarlı baz içeriği de belirlenebilmektedir. Eğer genomun yüksek oranda tekrar dizisi içermesi durumunda eğrinin tepesi daha geniş olacaktır. Ancak elde edilen Şekil 1'deki eğrinin tepesinin çok geniş olmaması nedeniyle antepfıstığında tekrarlı dizilerin yüksek oranda olmadığı ortaya çıkmıştır.

K-mer analizleri ile aynı zamanda heterozigotluk oranı da belirlenebilmektedir. Eğer eğrinin yarı noktasında küçük bir eğri belirmiş olması o türün yüksek heterozigot seviyesine sahip olduğunu göstermektedir. Şekil 1 incelendiğinde de, küçük bir eğrinin de varlığı açıkça görülmektedir. Bu nedenle, antepfıstığının yüksek oranda heterozigot olduğu söylenebilir.

Bunların ötesinde, antepfıstığı genomunda GC yoğunluğu da belirlenmiştir. Ortalama sekanslama yoğunluğu ile GC içeriği grafiği Şekil 2'de gösterilmiştir. Şekil incelendiğinde, GC dağılımının yaklaşık 40x sekanslama yoğunluğunda olduğu görülecek olup bu sonuç da yukarıda elde edilen sonuçlar ile uyum göstermektedir. Ayrıca, grafikte yaklaşık 20-25x sekanslama yoğunluğunda görülen GC dağılımı yüksek heterozigotluk oranından kaynaklanmaktadır. GC dağılımından elde edilen sonuç K-mer analizlerinden elde edilen

sonuçlar ile uyum göstererek antepfıstığının yüksek heterozigot oranına sahip olduğunu desteklemiştir.

Cinsiyet İle İlişkili Markörlerin Belirlenmesi

RAD sekanslaması sonucu cinsiyet ile ilişkili aday 38 adet SNP lokusu belirlenmiştir. Bunlardan 13 tanesi primer dizaynı için gerekli diziyeye sahip olmuştur. Bu 13 markörün öncelikle doğru çalışıp çalışmadıkları SNaPshot analizleri ile 42 F1 bitkisi ve 64 antepfıstığı çeşidinde analiz edilerek belirlenmiştir. SNaPshot analizleri sonucunda 8 markörün cinsiyeti %100 olarak ayırdığı belirlenmiştir. Bu 8 SNP markörü, pratik anlamda ıslah programlarında kullanmak üzere Real-Time PCR cihazında HRM analizleri ile de test edilmiştir. Yapılan HRM analizleri sonucunda 4 adet SNP markörün cinsiyeti %100 ayırdığı belirlenmiştir. Cinsiyet markörleri aynı zamanda yabancı *Pistacia* türlerinde de test edilmiş ancak sözkonusu SNP markörlerin yabancı türlerde cinsiyeti ayırmadığı belirlenmiştir.

Antepfıstığında ZW/ZZ Cinsiyet Belirleme Sistemi

Çalışma kapsamında bulunan cinsiyet ile ilişkili tüm markörler dışı bitkilerde heterozigot, erkek bireylerde ise homozigot olarak görülmüştür. Bu durum antepfıstığının ZW/ZZ cinsiyet sistemine sahip olduğu hipotezini ortaya çıkarmıştır. Cinsiyet belirleme ile ilgili daha ayrıntılı bilgilere Kafkas ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada ulaşılabılır.

Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmada öncelikle antepfıstığı genomunun yapısı ortaya konulmuştur. Buna göre antepfıstığı genomunun 600Mb civarında bir uzunluğa sahip olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, antepfıstığı genomunda tekrar dizilerinin çok fazla olmadığı, ancak antepfıstığının yüksek heterozigoti seviyesine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, antepfıstığı tüm genom dizisinin elde edilmesi istenmesi durumunda bu konulara dikkat edilerek bir sekanslama planının yapılması gerekmektedir.

Ayrıca çalışma kapsamında cinsiyet ile ilişkili SNaPshot analizleri sonucunda 8 adet SNP markörü belirlenmiştir. Bunlardan ise 4 tanesinin Real-Time PCR cihazında HRM analizleri ile ıslah programlarında hızlı bir şekilde ve düşük bir maliyetle uygulanabileceği belirlenmiştir.

Bunların ötesinde, antepfıstığının ZW/ZZ cinsiyet belirleme sistemine sahip olduğu bulunmuştur.

Teşekkür

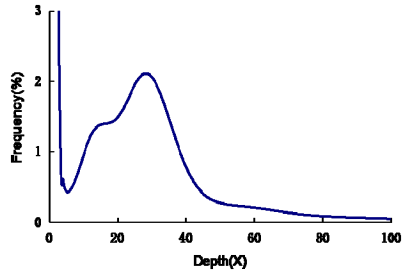
Bu makaledeki çalışmaların yapılmasına maddi destekte bulunan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna (TÜBİTAK-TOVAG 1130962), Tarım Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğüne (TAGEM/13/ARGE/22), Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (ZF2013KAP4 ve FUK-2014-2637) teşekkürlerimizi sunarız.

Kaynaklar

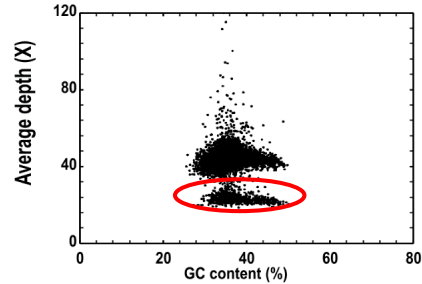
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Esfandiari, B., Davarynejad, G.H., Shahriari, F., Kiani, M., Mathe, A., 2012. Data to the sex determination in *Pistacia* species using molecular markers. *Euphytica* 2:227-31.
- Hormaza, J.I., Dollo, L., Polito, V.S., 1994. Determination of relatedness and geographic movements of *Pistacia vera* (Pistachio; Anacardiaceae) germplasm by RAPD analysis. *Economic Botany* 48 (4):349-358.
- Kafkas, S., Acar, I., Gozel, H., 2005. A project on developing monoecious pistachio (*Pistacia vera* L.) populations and determination of sex mechanism in *Pistacia*. *Options Mediterraneennes* 63:57-60.
- Kafkas, S., 2006. Phylogeny, evolution and biodiversity in the genus *Pistacia* (Anacardiaceae). In: Sharma AK, and Sharma A. (eds) *Plant genome: biodiversity and evolution. Volume 1, part C, Phanerogams (Angiosperm Dicotyledons)*, Science Publishers, Enfield (NH), Jersey, Plymouth, USA, 525-557pp.
- Kafkas, S., Özkan, H., Ak, B.E., Açar, I., Atlı, H.S., Koyuncu, S., 2006. Detecting DNA polymorphism and genetic diversity in a wide pistachio germplasm: comparison of AFLP, ISSR and RAPD markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 131(4): 522-529.
- Kafkas, S., Khodaeiaminjan, M., Güney, M., Kafkas, E., 2015. Identification of sex-linked SNP

markers using RAD sequencing suggests ZW/ZZ sex determination in *Pistacia vera* L. *BMC Genomics* 16:98.

- Uzun, M., Acar, I., Atlı, H.S., Arpacı, S., Sarpkaya, K., Gözel, H., 2011. Breeding of new pistachio cultivars by hybridization in Turkey. *Acta Hort.* (ISHS) 912:321-325.
- Yakubov, B., Barazani, O., Golan-Goldhirsh, A., 2005. Combination of SCAR primers and Touchdown-PCR for sex identification in *Pistacia vera* L. *Sci. Hort.* 103: 473-478.



Şekil 1. Antepfıstığında K-mer frekansı ile K-mer derinliği arasındaki ilişki



Şekil 2. Antepfıstığı GC içeriği grafiği