

RAPD-PCR Yöntemiyle Türkiye'deki *Hyacinthella* Schur (*Liliaceae*) Türleri Arasındaki Polimorfizm ve Filogenetik İlişkilerin Belirlenmesi¹

Emine ARSLAN²

Özet: Bu çalışmada Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA - Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD-PCR) *Hyacinthella* türlerini birbirinden ayırt etmek için kullanılmıştır. Kullanılan primerler, *Hyacinthella* türleri arasındaki genetik uzaklıkları belirlemede faydalı olduğu tespit edilmiştir. O-3 ve O-11 primerlerine göre *H. heldreichii* bireyleri genetik bakımdan birbirinin aynı bulunurken, O-3, O-11 ve O-4 primerlerine göre hem türler hem de bazı türün bireyleri arasında polimorfizm olduğu belirlenmiştir. *H. hispida*, *H. lineata* ve *H. glabrescens* bireyleri arasında oldukça yüksek polimorfizm görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: RAPD-PCR, *Hyacinthella*

Polymorphism and Phylogenetic Relations Among Turkish Species in Genus *Hyacinthella* (*Liliaceae*) as Determined by RAPD-PCR

Abstract: In this study, Random Amplified Polymorphic DNA - Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) was used to identify *Hyacinthella* Schur species. Primers used were found useful to determine genetical distances among *Hyacinthella* species. Polymorphism was seen among both species and the individuals of some species with respect to O-3, O-11 and O-4 primers, while the individuals of *Hyacinthella heldreichii* were determined to be genetically the same according to the O-3 and O-11 primers used. Fairly high polymorphism was observed within the individuals of *H.hispida*, *H.lineata* and *H.glabrescens*.

Key Words: RAPD-PCR, *Hyacinthella*

Giriş

Hyacinthella soğanlı bitkiler grubunda 17 türle temsil edilen küçük bir cinstir. Türkiye'de 10 türle temsil edilmektedir ve bu türlerden 9 tanesi ülkemiz için endemiktir. Bu cinse ait türlerin büyük kısmı Akdeniz Fitocoğrafik bölgesinde yayılış göstermekle birlikte, İran Turan Fitocoğrafik bölgesinde yayılış gösteren türler de mevcuttur. *Hyacinthella* türleri; *H. hispida* J.Gay, *H. heldreichii* Boiss, *H. glabrescens* Boiss, *H. campanulata* Persson &Wendelbo, *H. lineata* Steudel, *H. acutiloba* Persson&Wendelbo, *H. lazulina* Persson & Persson, *H. micrantha* Boiss, *H. nervosa* Bertol, *H. siirtensis* Mathew in Kew Bull [1]. Bugüne kadar *Hyacinthella* türlerinin detaylı moleküler veya taksonomik çalışmaları yapılmamıştır.

Hyacinthella cinsi, *Muscari* ve *Bellevalia* cinsleri ile oldukça benzerlik göstermektedir. Fakat bu cinse ait türlerin kromozomları akraba cinslere nisbetle daha küçüktür [1-2].

¹ Bu çalışma SÜAF (99/075) tarafından desteklenmiş ve Emine Arslan'ın Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir.

² Selçuk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Konya

Ekim ve ark. (2000)'nin bildirdiği gibi bu cinse ait türlerden *H. lazulina* kritik şekilde tehlikede kategorisinde değerlendirilirken *H. campanulata* ve *H. hispida* zarar görebilir kategorisinde, diğer türler ise düşük risk altındaki kategorilerde yer almıştır. Bu nedenle endemik ve nadir olan bu cinsin habitatlarında korunmasına önem verilmesi gerekmektedir [3].

Son yıllarda tür tanımlanması, türler arası ve tür içi polimorfizmi belirlemek için bazı moleküler teknikler kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan bazıları Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) [4], Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) [5], Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD-PCR)'dir [6-7]. RFLP'ler filogenetik ağaçların gelişmesinde, özellikle bağlantı kurmada ve genomik haritaları geliştirmede yaygın olarak kullanılmıştır [4]. PCR yöntemi teşhis ve moleküler klonlamada değerli bir araç olmakla birlikte aynı zamanda da DNA örneklerinin katlanarak milyonlarca çoğaltılmasını sağlar. Hedef DNA dizilerine birleşen oligonükleotidler polimeraz reaksiyonlarında primer olarak kullanılmıştır [8].

William ve ark. (1990) ve Welsh ve Mc Clelland (1990), rastgele primerler kullanarak polimeraz zincir reaksiyonu ile rastgele DNA dizilerinin çoğaltılmasında yeni bir teknik bulmuşlardır. Bu tekniğin avantajları, yüksek polimorfik değerleri bulmak için uygun olması, basit, hızlı ve genç fideler ve bir tek tohumun analizine izin veren genomik DNA'nın çok küçük miktarlarına ihtiyaç duymasıdır [9-10]. Tekniğin dezavantajı güvenilirliğinin çok sınırlı olması, farklı laboratuvarlarda, farklı araştırmacıların elinde ve hatta bir PCR cihazından diğerine farklı sonuçlar elde edilebilmesidir [6]. Bu çalışmada amaç, RAPD-PCR kullanılarak *Hyacinthella* türleri arasındaki filogenetik akrabalıkları, tür içi polimorfizmi ve genetik varyasyonları analiz etmektir.

Materyal Ve Metod

Bitki materyalleri: *H. hispida*, *H. heldreichii*, *H. glabrescens*, *H. campanulata*, *H. lineata*, *H. acutiloba* ve *H. lazulina* Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanmıştır. Tablo 1'de türlerin isimleri ve lokaliteleri verilmiştir. Yedi farklı *Hyacinthella* türünde, toplam onyediy primer denenmiş ve rastgele seçilen üç primer kullanılarak genetik uzaklıklar hesaplanmıştır.

Tablo 1. Bu çalışmada kullanılan *Hyacinthella* türlerinin isimleri ve lokaliteleri.

<i>H. hispida</i>	C5 Niğde: Ulukışla-Pozantı arası, Çiftahan,1000m., 14.03.1999, E. ARSLAN
<i>H. heldreichii</i>	C3 Antalya: Akseki, Yarpuz Dağı, 1200m., 31.03.1999, E. ARSLAN
<i>H. lazulina</i>	C4 Konya: Karapınar, Öbektaş köyü, 1350m, 14.03.1999, E. ARSLAN
<i>H. glabrescens</i>	C5 Adana: Bürücek, 1250-1300m.,14.03. 1999, E. ARSLAN
<i>H. campanulata</i>	C4 Konya: Konya-Beyşehir arası, Altınapa Barajı'na 5.km kala1350-1400m.,13.01.1999, E. ARSLAN
<i>H. lineata</i>	C2 Afyon: Dazkırı, Kepestepe mevki, 860-870m,05.05.1999,E. ARSLAN
<i>H. acutiloba</i>	B6 Kayseri: Sarız Binboğa Dağı, Yalak mevki, 1450-1500m ve 1800-2000m, 05.05.1999, H. DUMAN

DNA İzolasyonu: Bitki materyalinden genomik DNA'nın elde edilmesi için her türün bireylerinden alınan yapraklar ayrı ayrı sıvı azot ilave edildikten sonra porselen havanda ezilmiştir. DNA, 50mM Tris (pH 8.0), 50mM EDTA (pH 8.0), 100mM NaCl ve %1 SDS ile çıkarılmıştır. Fenol kloroform (1:1) oranında tüplere eklenerek vortex ile karıştırılmıştır. Tüpler santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. DNA %70lik alkolde yıkandıktan sonra kurutulmuştur. DNA örnekleri T₁₀E₁ tamponunda -20°C'de saklanmıştır [11].

Primerler: PCR amplifikasyonu için Operon primerleri kullanılmıştır. Bunlar O-3: 5'-GTG ACG TAG G-3', O-4: 5'- AAT CGG GCT G-3', O-11: 5'-TTA TGA AAC GAC GGC CAG T-3' dir.

Amplifikasyon: İzole edilen DNA PCR'la çoğaltılmıştır [12]. Reaksiyonlar, 10mM Tris HCl (pH 8.8), 50mM KCl, % 0.8 Nonidet P40, 2mM MgCl₂, dATP, dGTP, dCTP ve dTTP (MBI Fermentas)'nin her birinden 100um; 25ng genomik DNA ve 1U Taq DNA Polimeraz (MBI

Fermentas) içeren 100 µl'lik hacimde yapılmıştır. Thermal Cycler'ın bir döngüsü, 96 °C'de 30 sn, 30 °C'de 30sn ve 72 °C'de 30sn yapılmıştır. Toplam 45 döngü yapılmıştır.

Çoğaltılmış DNA fragmentleri %2'lik Agaroz jelde 1xTAE ve 1x TBE tamponu içinde yürütülmüştür [13]. Jeller ethidium bromid ile boyanmış ve jellerin fotoğrafları çekilmiştir.

Veri Analizleri: Türler arasındaki genetik uzaklıkları bulmak için agaroz jel elektroforezinden çekilen fotoğraflara göre bantların varlığı ve yokluğu belirlenerek bir tablo oluşturulmuştur. Bu tablodan yola çıkılarak Syntax programındaki Jaccard formülüne göre dendrogramlar hazırlanmıştır.

Araştırma Sonuçları Ve Tartışma

Bu çalışmada kullanılan *Hyacinthella* cinsi tür ve bireylerine ait agaroz jel elektroforezinden çekilmiş fotoğraflara göre DNA bantlarının varlığı ve yokluğundan faydalanılarak Syntax programı ile dendrogram hazırlanmıştır.

H. glabrescens, *H. acutiloba*, *H. hispida* türleri O-4 primeri ile RAPD-PCR aracılığıyla amplifiye edilmiştir (Şekil 1). Bu primerle yapılan dendrograma göre (Şekil 2), iki ana küme oluşmuştur. Birinci küme iki alt kümeden oluşmuştur. Birinci alt kümede iki tane *H. glabrescens* (1-2) bireyi ile *H. hispida* 1 birbirinin aynı bulunarak bir grup oluşturmuş ve diğer *H. glabrescens* 3 bireyi ile %70 oranında genetik olarak uzak bulunmuştur. İkinci alt kümedeki *H. glabrescens* 4 bireyi birinci alt kümeye yaklaşık %73 oranında uzak bulunmuştur. İkinci kümede yer alan *H. acutiloba* birinci kümeye oldukça uzak bulunmuştur. *H. glabrescens*, Türkiye Florasındaki filogenetik akrabalığı destekleyecek şekilde *H. hispida*'ya, *H. acutiloba*'dan daha yakın bulunmuştur. Bu dendrogramda tür içi ve türler arası polimorfizm açıkça görülmektedir.

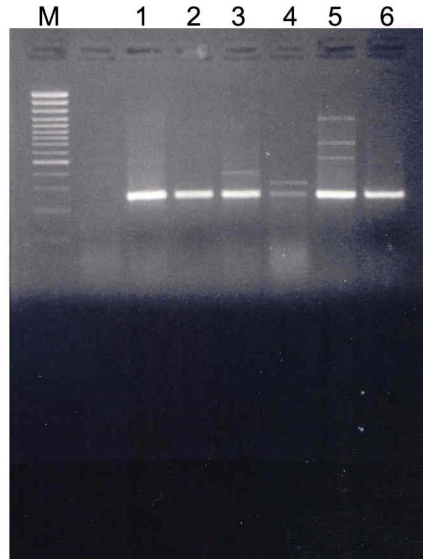
Şekil 3'de görüldüğü gibi *H. heldreichii*, *H. lazulina*, *H. hispida*, *H. lineata* ve *H. campanulata* türlerinin bireyleri O-11, O-3 primerleri ile multipleks PCR ile amplifiye edilmiştir. Bu primerlerle yapılan dendrograma göre (Şekil 4) *H. heldreichii*'nin üç bireyi birbirinin aynı bulunarak bir küme oluşturmaktadır. *H. lazulina* 1 ve *H. hispida* 2 birbirinin aynı ikinci bir küme oluşturmaktadır. *H. lineata* 1 ve *H. campanulata* 1 üçüncü bir kümeyi oluştururken birbirine genetik bakımdan biraz uzak bulunmuştur. Bu sonuçlar Türkiye florasındaki morfolojik karakterlere dayanılarak yapılan filogenetik akrabalığı desteklemektedir. Bu dendrogramda türler arası polimorfizm görülürken tür içi polimorfizm görülmemiştir. Bu primerler türler arası polimorfizm için uygun bulunmuştur.

Bu çalışmada *Hyacinthella* türleri arasındaki genetik uzaklıklar belirlenmeye çalışılmıştır. O-3, O-11 primerlerine göre *H. heldreichii* türünün bireyleri genetik bakımdan birbirinin aynı bulunurken, O-4 ve O-3, O-11 primerlerine göre de bazı tür içi ve türler arası polimorfizm görülmüştür. Örneğin, *H. hispida*, *H. lineata* ve *H. glabrescens* bireyleri arasında oldukça fazla polimorfizm görülmüştür. Dolayısıyla bu türler taksonomik sınıflandırma açısından oldukça polimorfik türlerdir.

Kaynaklar

- [1] Davis, P.H., **Flora of Turkey and the East Aegean Islands** Edinburgh at the University Press. Vol. 8 (1965).
- [2] Persson, K., Persson, J., **A New Species And Additional Chromosome Counts Of Hyacinthella In Turkey**, Nord. J. Bot. 12: 615-620 (1992).
- [3] Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., Adıgüzel, N., **Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı**, Ankara (2000).
- [4] Tanskley, S.D., Young, N.D., Peterson, A.H., Bornierbale, M.W., **RFLP Mapping In Plant Breeding New Tools For An Old Science**, Biotechnologia, 7: 257-264 (1989).
- [5] Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., **Primer-Directed Enzymatic Amplification Of DNA With A Thermostable DNA Polymerase**, Science, 239: 487-491 (1988).

- [6] Williams, J.V., Kubelik, A.R., Livak, K., Rafalski, J.A., Tingey, S., **DNA Polymorphism Amplified By Arbitrary Primers Are Usefull As Genetic Markers**, Nucleic Acid Research, 18(22): 6531-6535 (1990).
- [7] Welsh, J., Mc Clelland, M. **Fingerprinting genomes using PCR with arbitrarily primers**, Nucl. Acids Res. 18: 7213-7218 (1990).
- [8] Weining, S., Langridge, P., **Identification And Mapping Of Polymorphisms In Cereals Based On The Polymerase Chain Reaction**, Theor. Appl. Genet., 82: 209-216 (1991).
- [9] Yu, K.F., Deynze, A.V. and Pauls, P., **Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis**, Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, 287-301(1993).
- [10] Hu, J. and Quiros, C.F., **Identification Of Broccoli And Cauliflower Cultivars With RAPD Markers**, Plant Cell Reports, 10: 505-511 (1991).
- [11] Havey, M.J., **Restriction Enzyme Analysis Of The Chloroplast And Nuclear 45S Ribosomal DNA Of Allium Sections Cepa And Phyllodolon (Alliaceae)**, Pl. Syst. Evol., 183:17-31 (1992).
- [12] Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J., White, T.J., **PCR Protocols**, Academic Press, 3-11, USA. (1990).
- [13] Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Second addition. Cold Spring Harbour. Press Cold Spring Harbour, New York (1989).



Şekil 1. Bazı *Hyacinthella* türleri ve bireylerinin O-4 primeri ile rastgele çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.

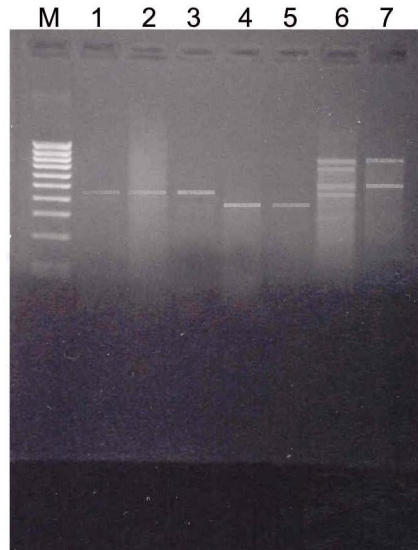
M: DNA Ladder Plus

1. *H. glabrescens* 1
2. *H. glabrescens* 2
3. *H. glabrescens* 3
4. *H. glabrescens* 4
5. *H. acutiloba*
6. *H. hispida* 1



Şekil 2. Şekil 1'deki *Hyacinthella* türleri ve bireylerinin Syntax programı ile hazırlanmış dendrogramı.

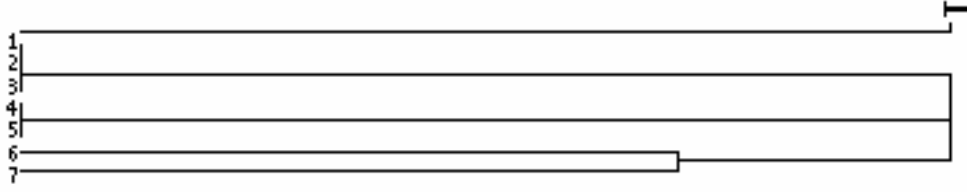
1. *H. glabrescens* 1
2. *H. glabrescens* 2
3. *H. glabrescens* 3
4. *H. glabrescens* 4
5. *H. acutiloba*
6. *H. hispida* 1



Şekil 3. Bazı *Hyacinthella* türleri ve bireylerinin O-3, O-11 primerleri ile rastgele çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.

M: DNA Ladder

1. *H. heldreichii* 1
2. *H. heldreichii* 2
3. *H. heldreichii* 3
4. *H. lazulina* 1
5. *H. hispida* 2
6. *H. lineata* 1
7. *H. campanulata* 1



Şekil 4. Şekil 3'deki *Hyacinthella* türleri ve bireylerinin Syntax programı ile hazırlanmış dendrogramı.

1. *H. heldreichii* 1
2. *H. heldreichii* 2
3. *H. heldreichii* 3
4. *H. lazulina* 1
5. *H. hispida* 2
6. *H. lineata* 1
7. *H. campanulata* 1