

Zeytinde Genom Haritalama Çalışmaları

Genome Mapping Studies in Olives

Nurengin METE, Öznur ÇETİN

Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Bornova/İZMİR

Geliş tarihi: 29.03.2017

Kabul tarihi: 20.05.2017

Özet

Zeytin ağacı, insanoğlu tarafından ilk kültüre alınan bitki türlerinden birisi olup Akdeniz kültürünün bir parçası olarak görülmektedir. Zeytinin kültüre alınmasından günümüze kadar geçen süre içerisinde oluşan doğal melezlemeler neticesinde farklı ülkelerde birçok çeşit ortaya çıkmıştır. Buna bağlı olarak zeytinde yapılan ilk moleküler çalışmalar daha çok genetik çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. Bununla birlikte son yıllarda bağlantı (linkage) haritalama ve QTL lokuslarının belirlenmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Zeytinde kantitatif karakter lokuslarının belirlenmesine yönelik çalışmalar oldukça azdır. Ancak günümüze kadar erken seleksiyon kriteri olarak kullanılabilen etkili bir markör geliştirilememiştir. Buna yönelik çalışmalar halen devam etmektedir.

Anahtar kelimeler: Zeytin, *Olea europaea* L., DNA, bağlantı, QTL.

Abstract

Olive tree is one of the plant species firstly cultivated by humankind and considered as a part of Mediterranean culture. Numerous varieties have emerged in different countries as a result of natural hybridizations originated in the time passed from cultivation of olive to the present day. Depending on this, preliminary molecular studies conducted on olive were mostly carried out in order to determine genetic variability. On the other hand, studies have been conducted regarding linkage mapping and determination of QTLs in the recent years. Number of studies on determination of quantitative trait loci in olive is very limited. However, an effective marker that can be used as early selection criteria have not been developed until today. Related studies have still continued.

Keywords: Olive, *Olea europaea* L., DNA, linkage, QTL.

Giriş

Zeytin (*Olea europaea* L.) ekonomik önemi olan ve Akdeniz Havzası'nda yetişirilen en eski meyve türlerinden birisidir (Bracci ve ark., 2011). Zeytinde genetik çeşitlilik günümüze kadar farklı moleküler tekniklerle araştırılmıştır. Ancak moleküler markörlerin birçok avantajlarına rağmen zeytinde önemli karakterleri kontrol eden genlerle ilgili bilgiler henüz yeterli düzeyde görülmemektedir (Belaj ve ark., 2011; Bracci ve ark., 2011;

Dominguez-Garcia ve ark., 2012; Ben Sadok ve ark., 2013).

Moleküler bitki ıslahında bağlantı gruplarının ve genetik haritaların oluşturulmasında, DNA düzeyindeki farklılıklara göre değişik markör sistemleri kullanılmaktadır. Bu markörlerden bir ya da birkaç kullanılarak genetik haritalar oluşturulmakta ve genlerin kromozomlar üzerindeki yerlerinin (lokus) tespit edilmesi mümkün olabilmektedir. Kantitatif özellikleri kontrol eden genleri taşıyan

bölgeler kantitatif özellik gen bölgeleri (Quantitative trait loci, QTL) olarak adlandırılmaktadır.

Genetik bağlantıların oluşturulmasında ideal olan bir türün haploid kromozom sayısı kadar linkage (bağlantı) grubu oluşturulmasıdır. Ayrıca bağlantı gruplarındaki iki markör arası mesafenin 20 cM'dan fazla olmaması gerektiği bildirilmektedir (Vienne, 2003). Yabancı tozlanan ve heterozigot yapıya sahip türler için yapılacak genetik haritalama 'double pseudo-testcross' stratejisi uygun bir yöntem olarak görülmektedir (Grattapaglia ve Sederoff, 1994). Bu konuda Vienne (2003), çok yıllık bitkilerde F1 bireylerinin genetik haritalama çalışmalarında aynı stratejinin uygun olduğunu ve bu yöntemde ana ve baba bitki için ayrı ayrı genetik harita oluşturulduğunu belirtmiştir. Bu stratejide çok yıllık bitkilerin genetik linkage haritalarının başarılı bir şekilde oluşturulması ebeveynler arasındaki açılıma ve türlerin heterozigotluk seviyesine bağlıdır (Cervera ve ark., 2001; Scott ve ark., 2005).

Zeytin kromozomlarının küçük, çok sayıda ve benzer yapıda olması nedeniyle kromozomların tamamının tatmin edici derecede karakterize edilmesinin zor olduğu bildirilmiştir (Bracci ve ark., 2011). Rugini ve ark. (1996) bazı İtalyan çeşitlerinde zeytin çekirdek DNA'sını sitometrik metodlarla ölçmüştür ve her bir haploid çekirdekte Frantoio için 2.26 pg, Leccino için ise 2.20 pg bulmuşlardır. Oysaki Bitonti ve ark. (1999) bu değeri Dolce Agogia'da 3.90 pg/2C, Pendolino için ise 4.66 pg/2C olarak tespit etmişlerdir. Loureiro ve ark. (2007) tarafından yapılan bir başka çalışmada 6 Portekiz çeşidi ve 1 yabani zeytin ait çekirdek DNA'larının miktarlarının Portekiz çeşitleri için 2.90 ± 0.020 ile 3.07 ± 0.018 pg/2C arasında değiştiğini, yabani zeytin için ise 3.19 ± 0.047 pg/2C olduğu saptanmıştır. Bu değer yaklaşık 3120 Mbp'ne karşılık gelmektedir (1 pg yaklaşık 978 Mbp, Dolezel ve ark., 2003).

Zeytinde Genom Haritalama Çalışmaları

Zeytinde moleküler markör çalışmaları daha çok genetik çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla yapılmaya başlanmıştır (Bracci ve ark., 2011). Bununla

birlikte son yıllarda linkage haritalama ve QTL lokuslarının belirlenmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Zeytinin ilk linkage haritası De La Rosa ve ark. (2003) tarafından oluşturulmuştur. Araştırmacılar; RAPD, AFLP, RFLP ve SSR tekniklerini kullandıkları çalışmada Leccino X Dolce Agogia melez popülasyonundan elde edilen 95 F1 bireyde double pseudo test-cross haritalama stratejisini kullanarak ana ve baba için ayrı ayrı linkage haritalaması yapmışlardır. Buna göre; Leccino çeşidine 249 markör içeren 39 bağlantı grubu ve Dolce Agogia çeşidine 236 markör ile 30 bağlantı grubu olduğunu belirtmişlerdir. Toplam harita uzunluğunu Leccino için 2.765 cM, Dolce Agogia için ise 2.445 cM olarak saptamışlar ve markörler arasındaki ortalama mesafenin sırasıyla 13.2 cM ve 11.9 cM olduğunu bildirmiştir.

Wu ve ark. (2004) RAPD, SCAR ve SSR markör yöntemlerini kullanarak Frontoio X Kalamata F1 popülasyonunda linkage haritalaması yapmışlardır. Çalışmada 104 F1 birey kullanılmış ve ana-baba için ayrı ayrı haritalar oluşturularak bunlar birleştirilmiştir. Buna göre, Kalamata çeşidi için 759 cM uzunlığında 23 linkage grubu belirlenmiştir. İki markör arasındaki ortalama mesafe 11.5 cM olarak bulunmuştur. Frontoio çeşidi için ise 798 cM uzunlığında 27 linkage grubu belirlenmiştir. Markörler arasındaki ortalama mesafe ise 12.3 cM olarak tespit edilmiştir.

Gemlik X Edincik Su melez popülasyonunda yürütülen bir başka çalışmada Gemlik çeşidi için 2891 cM uzunlığında, 105 markör içeren 16 linkage grubu oluşturulmuştur. Oluşturulan bu genetik haritada yapılan QTL analizine göre, çekirdek ağırlığı için 2 ($LOD > 2$), meye ağırlığı için 1 ($LOD > 2$) ve yağ asitleri miktarı için ise 7 adet QTL markörünün belirlendiği ifade edilmiştir (İpek v ark., 2008).

El Aabidine ve ark. (2010) tarafından Picholine Marocaine X Picholine du Languedoc çeşitlerine ait 140 F1 birey ve ebeveynlerde yapılan çalışmada AFLP, SSR, ISSR, SCAR ve RADP markör yöntemleri kullanılmıştır. Toplam olarak 592 markörün kullanıldığı haritalama çalışmasında; 47 SSR, 509 AFLP, 27 ISSR, 8 RADP ve 1 SCAR

markörü bulunmuştur. Ana ebeveyne ait haritada 175 markör kullanılmış ve 40 linkage grubu oluşmuştur. Harita uzunluğu 1547.4 cM olarak bulunmuştur. Babaya ait haritada ise 38 linkage grubunun 170 markör içerdiği ve toplam harita uzunluğunun 1428.0 cM olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar, çalışma neticesinde oluşturulan söz konusu haritaların QTL bölgelerinin bulunmasında faydalı olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Khadari ve ark. (2010) Oliviere X Arbequina kombinasyonundan elde edilen 147 F1 bireyde double pseudo test-cross haritalama yöntemini kullanarak linkage haritalaması yapmışlardır. Anaya ait haritada toplamda 222 markör (178 AFLP, 37 SSR, 7 ISSR) kullanılmış ve 36 linkage grubu oluşturulmuştur. Harita uzunluğu 2210.0 cM olarak saptanmış, iki markör arası ortalama uzaklık 11.2 cM, maksimum mesafe ise 48.5 cM olarak tespit edilmiştir. Babaya ait harita ise 174 AFLP, 39 SSR ve 6 ISSR olmak üzere 219 markörden oluşmuştur. Toplam 31 linkage grubu bulunan haritanın uzunluğu 1966.2 cM olarak tespit edilmiştir. Ortalama markör mesafesi ise 10.3 cM bulunmuştur. Araştırmacılar haritaların doygunluğunun yeterli olmamasına rağmen bazı QTL bölgelerinin tespit edilmesinde kullanılabilceğini belirtmişlerdir.

Picual ve Arbequina melez kombinasyonundan elde edilen 91 F1 melez bireyde DArT-SNP ve SSR moleküller markör teknikleri ile linkage haritalamanın yapıldığı çalışmada, Picual çeşidi için 47, Arbequina çeşidi için 39 linkage grubu bulunmuştur. Ancak grupların büyük çoğunluğunun 2 markörden oluşması nedeniyle sadece 23 linkage grubu çalışmada verilmiştir. Buna göre, Arbequina çeşidine ait haritada toplamda 392 markör (23 SSR+369 DArT) ve 23 linkage grubu, Picual çeşidi için ise 257 markör ile (24SSR+233DArT) yine 23 linkage grubu oluşturulmuştur. Linkage gruplarının toplam uzunluğu Picual çeşidi için 1205.1 cM, Arbequina çeşidi için ise 1639.3 cM olarak belirlenmiştir. Picual çeşidinde iki markör arasındaki ortalama mesafe 9.64 cM olurken Arbequina çeşidinde 8.04 cM olduğu ifade edilmiştir (Dominguez-Garcia ve ark., 2012).

Zeytinde verimliliğin genetik temellerinin araştırılması amacıyla Oliviere X Arbequina melez popülasyonunda yürütülen çalışmada, Oliviere çeşidi için 1745.3 cM uzunlığında 362 markör içeren 25 linkage belirlenmiş ve iki markör arası ortalama uzaklık 8.23 cM olarak saptanmıştır. Arbequina çeşidi için ise 362 markör içeren 1597.6 cM uzunlığında 21 LG (linkage group) belirlenmiştir. Bu harita için ortalama markör uzaklığının 6.34 cM olduğu belirtilmiştir. Her iki çeşit için 2148.4 cM uzunlığında birleşik bir linkage haritası oluşturulmuş ve kantitatif özellik lokuslarının belirlenmesine yönelik yapılan çalışmada kullanılan bu haritada verimlilikle ilişkili 35 aday QTL bölgesi tespit edildiği açıklanmıştır. Araştırmada, zeytinde verimliğin karışık bir genetik kontrol altında olduğu belirtilmiştir (Ben Sadok ve ark., 2013).

Atienza ve ark. (2014) Picual X Arbequina zeytin melez kombinasyonunda ağaç gelişme kuvveti ve bazı meyve özellikleri bakımından QTL haritalaması yapmışlardır. Buna göre, yağ içeriği için 1. ve 10. linkage grubunda belirlenen QTL'lerin %20-30 civarında fenotipik varyasyona bağlı olduğu belirtilmiştir. Nem oranına ilişkin olarak 1., 10. ve 17. linkage grubunda QTL'ler belirlenmiştir. Meyve et oranına ilişkin QTL'ler 10. ve 17. linkage gruplarında bulunmuştur. Bu bağlamda daha önce oluşturulmuş olan Picual haritasına meyve ağırlığı ve gövde çapını içeren 5 yeni QTL eklenmiştir. Çalışmada belirlenen QTL'lerin 1., 10. ve 17. linkage gruplarında kümelendliğini ifade eden araştırmacılar, bu sonuçların markör destekli seleksiyonda (MAS) kullanılması için önemli bir adım olduğunu belirtmişlerdir.

Zeytinde haploit kromozom sayısına sahip (23 bağlantı grubu) ve yüksek yoğunlukta markör içeren ilk bağlantı grupları TAGEM/BBAD/12/A08/P06/3 projesi kapsamında ülkemizde oluşturulmuştur. 92 F1 birey ve ebeveynlerle birlikte 94 genotipte SSR ve DArT-SNP markör analizleri kullanılarak yapılan çalışmada Memecik X Uslu melez popülasyonu haritalanmış ve ebeveynlerde toplamda 3903 markör saptandığı belirtilmiştir. Araştırmacı bağlantı gruplarının toplam uzunluğunu

Memecik çeşidinde 2921.9 cM, Uslu çeşidinde ise 2543.2 cM olarak saptadığını ifade etmiştir. Bağlantı gruplarının içерdiği toplam markör sayısı ve iki markör arası ortalama mesafe sırasıyla Memecik çeşidinde 2071 markör, 1.41 cM; Uslu çeşidinde ise 1836 markör ve 1.38 cM olarak belirlendiği açıklanmıştır (Mete, 2015). Bu çalışmadan elde edilen markör sayısı daha önceki en yoğun markör içerikli bağlantı gruplarının (Dominguez-Garcia ve ark., 2012), (649 markör) yaklaşık 6 kat fazlasıdır. Çalışmadan elde edilen bağlantı gruplarında daha sonra yapılan QTL analiz sonuçlarına göre zeytinde meyve olgunlaşmasına etkili olduğu düşünülen 39 aday QTL bölgesi belirlenmiştir ($LOD > 2$). Bunların 21'i Memecik çeşidinde (LG2, LG21), 18'si ise Uslu çeşidinde (LG1, LG2, LG8, LG12, LG17) saptanmıştır. Zeytinde meyve eti sertliğine etkili 76 aday QTL bölgesi belirlenmiştir ($LOD > 2$). Bunların 28'i Memecik çeşidinde (LG1), 48'i Uslu çeşidinde (LG2, LG10) saptanmıştır. Et çekirdek ayrimı üzerine etkili olduğu düşünülen 9 aday QTL Uslu çeşidinde (LG1, LG5) belirlenmiştir ($LOD > 2$) (Çetin ve ark., 2016). Son olarak yine ülkemizde gerçekleştirilen bir başka çalışmada GBS (Genotyping By Sequencing), SSR ve AFLP markör teknikleri kullanılarak yüksek yoğunlukta bir linkage haritalaması gerçekleştirilmiştir. Gemlik X Edincik su çeşitlerine ait 121 F1 bireyi içeren popülasyonda yürütülen çalışmada Gemlik çeşidi

için 25 linkage grubu elde edilmiştir. Haritanın içeriği toplam markör sayısı 5643 ve iki markör arası ortalama mesafe 0.53 cM olarak belirlenmiştir. Araştırcılar bu haritanın zeytin ıslah programlarında QTL belirlenmesinde kullanılabilceğini ifade etmişlerdir (İpek ve ark., 2016).

Sonuç

Bilindiği gibi genom haritalama çalışmalarının temel amacı, markör destekli seleksiyona zemin hazırlamaktır. Bu amaçla araştırcılar zeytinin de dahil olduğu birçok meyve türünde yüksek yoğunlukta bağlantı haritalarının oluşturulması ve kantitatif özellik lokuslarının belirlenmesine yönelik çalışmalara devam etmektedir. Geçmişten günümüze zeytinde yapılan bağlantı haritalama çalışmaları 1970'li yıllarda zeytinci ülkelerde başlatılan melezleme programlarından elde edilen popülasyonlar üzerinde yürütülmüştür. Ancak, bu melez popülasyonları sadece morfolojik özelliklere göre oluşturulmuştur. Buna bağlı olarak elde edilen melez popülasyonlarda yeterli genetik varyasyon oluşmadığı söylenebilir. Zeytinde günümüze kadar önemli özelliklere ilişkin etkili bir markör tespit edilememesinde bu durumun da rol oynadığı düşünülmektedir. Bu nedenle, zeytinin genetik yapısı hakkında daha detaylı bilgilere ulaşabilmek için yeni melez popülasyonların oluşturulması gelecekte yapılacak çalışmalar için önemli bir zemin hazırlayacaktır.

Kaynaklar

- Atienza, S.G., Rosa, R. de la., Leo'n, L., Martu'n, A. and Belaj, A., 2014. Identification of QTL for agronomic traits of importance for olive breeding. Mol Breeding DOI 10.1007/s11032-014-0070-y.
- Belaj, A., Domínguez-García, M.C., Atienza, S.G., Martín-Urdíroz, N., De la Rosa, R., Satovic, Z., Martín, A., Kilian, A., Trujillo, I., Valpuesta, V. and Del Río, C., 2011. Developing a core collection of olive (*Olea europaea*L.) based on molecular markers (DArTs, SSRs, SNPs) and agronomic traits. Tree Genet. Genomes. Doi: 10.1007/s11295-011-0447-6.
- Ben Sadok, I., Celton, J-M., Essalouh, L., Zine El Aabidine, A., Garcia, G., Martinez, S., Grati-Kamoun, N., Rebai, A., Costes, E. and Khadari, B., 2013. QTL mapping of flowering and fruiting traits in olive. PLoS ONE 8(5):e62831.
- Bitonti, M.B., Cozza, R., Chiappetta, A., Contento, A., Mineli, S., Ceccarelli, M., Gelati, M.T., Maggini, F., Baldoni, L. and Cionini, P.G., 1999. Amount and organization of the heterochromatin in *Olea europaea* and related species. Heredity 83:188–195.
- Bracci, T., Busconi, M., Fogher, C. and Sebastiani, L., 2011. Molecular studies in olive (*Olea europaea* L.): overview on DNA markers applications and recent advances in genome analysis. Plant Cell Reports April 2011, Volume 30, Issue 4, pp 449-462.

- Cervera, M.T., Storme, V., Ivens, B., Gusmao, J., Liu, B.H., Hostyn, V., Slycken, J.V., Montagu, M.V. and Boerjan, W., 2001. Dense Genetic Linkage maps of Three *Populus* Species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) Based on AFLP and Microsatellite Markers. *Genetics*, 158: 787–809.
- Cetin, Ö., Mete, N., Kaya, H., Şahin, M., Hakan, M., Sefer, F., Güloğlu, U., 2016. Zeytinde (*Olea europaea* L.) Bağlantı Haritalarının Oluşturulması ve Bazı Özellikleri Kontrol Eden Genlerle İlişkili Kantitatif Özellik Lokuslarının (QTL) Saptanması. Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü. TAGEM/BBAD/12/A08/P06/3. Proje Sonuç Raporu.
- De la Rosa, R., Angiolillo, A., Guerrero, C., Pellegrini, M., Rallo, L., Besnard, G., Bervillé, A., Martin, A. and Baldoni, L., 2003. A first linkage map of olive (*Olea europaea* L.) cultivars using RAPD, AFLP, RFLP and SSR markers. *Theor. Appl. Genet.*, 106: 1273–1282.
- Dolezel, J., Bartos, J., Voglmayr, H. and Greilhuber, J., 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry Part A* 51A: 127–128.
- Dominguez-Garcia, M.C., Belaj, A., de la Rosa, R., Satovic, Z., Heller-Uszynska, K., Kilian, A., Martin, A. and Atienza, S.G., 2012. Development of DArT markers in olive (*Olea europaea* L.) and usefulness in variability studies and genome mapping. *Scientia Horticulturae*. 136, 50-60.
- El Aabidine, A.Z.; Charafi, J.; Grout, C.; Doligez, A.; Santoni, S.; Moukhli, A.; Jay-Allemand, C.; El Modafar, C. and Khadari, B., 2010. Construction of a genetic linkage map for the olive based on AFLP and SSR markers, *Crop Science* Vol. 50, No. 6, pp. 2291-2302. ISSN 1435-0645.
- Grattapaglia, D. and Sederoff, R., 1994. Genetic Linkage Maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using A Pseudo-Testcross: Mapping Strategy and RAPD Markers. *Genet i cs*, 137: 1121-1137.
- İpek, A., Gülen, H., Barut, E., Yalçınkaya, E., Öz, A.T. ve A.Tangu, N., 2008. Moleküler markörler kullanılarak önemli bazı standart zeytin çeşit ve melezlerinin DNA profillerinin belirlenmesi ve gen haritasının çıkarılması. Proje No: TOVAG-105 O 071. 67s.
- İpek, A., Yılmaz, K., Sıkıcı, P., Tangu, NA., Öz, AT., Bayraktar, M., İpek, M., Gülen, H., SNP Discovery by GBS in Olive and the Construction of a High-Density Genetic Linkage Map. *Biochemical Genetics* June 2016, Volume 54, Issue 3, pp 313-325.
- Khadari, B., El Aabidine, A.Z. and Grout, C., 2010. A Genetic Linkage Map of Olive Based on Amplified Fragment Length Polymorphism, Intersimple Sequence Repeat and Simple Sequence Repeat Markers *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 135(6):548-555.
- Loureiro, J., Rodriguez, E., Costa, A. and Santos, C., 2007. Nuclear DNA content estimations in wild olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea* var. *sylvestris* Brot.) and Portuguese cultivars of *O. europaea* using flow cytometry. *Genet Resour Crop Evol* 54:21–25.
- Mete, N. 2015. Zeytinde Genom Haritasının Oluşturulması ve Meyve Olgunlaşmasını Kontrol Eden Genlerle İlişkili DNA Markörlerinin Saptanması, Ege Üniversitesi, Doktora tezi, Bornova/İzmir. (https://tez.yok.gov.tr/UlusulTezMerkezi/TezGoster?key=X-M9ZoIuIoNTj2P7iY13hbyWFBPuG4_3NXXo9A3e1dCdpIUDjvZJqErO-Vr3qa8O)
- Rugini, E., Panelli, G., Ceccarelli, M. and Muganu, M., 1996. Isolation of triploid and tetraploid olive (*Olea europaea* L.) plants from mixoploid cv. ‘Frantoio’ and ‘Leccino’ mutants by *in vivo* and *in vitro* selection. *Plant Breed* 115:23–27.
- Scott, L.J., Shepherd, M., Nikles, D.G. and Henry, R.J., 2005. Low efficiency of pseudo-test-cross mapping design was consistent with limited genetic diversity and low heterozygosity in hoop pine (*Araucaria cunninghamii* Araucariaceae). *Tree Genet. Genomes* 1:124–134.
- Vienne, D., 2003. Construction of Genetic Linkage Maps. In: Molecular Markers in Plant Genetics and Biotechnology D. Vienne (ed.) Science Publishers Inc. pp. 47-79.
- Wu, S-B., Collins, G. and Sedgley, M., 2004. A molecular linkage map of olive (*Olea europaea* L.) based on RAPD, microsatellite, and SCAR markers, *Genome* vol: 47. p: 26-35.

İLETİŞİM

Dr. Nurengin METE
 Zeytinçilik Araştırma Enstitüsü
 Üniversite Cad. No:43
 Bornova/İZMİR
 e-posta: nurengin.mete@tarim.gov.tr

