

Bazı Yabani Vişne (*Prunus cerasus* L.) Tiplerinin RAPD Tekniği İle Moleküler Karakterizasyonu

Mehmet AKSU¹* Hasan Cumhur SARISU¹ Suat KAYMAK¹ Yusuf ÖZTÜRK¹ İbrahim GÜR¹ Hakkı KOÇAL¹

¹Meyvecilik Araştırma İstasyonu, Eğirdir, Isparta, Türkiye

Sorumlu Yazar

e-posta: mehmetaksu_43@hotmail.com

Geliş Tarihi : 30 Mart 2012

Kabul Tarihi : 15 Mayıs 2012

Özet

Bu çalışmada kiraz ve vişne türlerinde anaç olarak kullanılmak üzere selekte edilen yabani vişneler RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) moleküler yöntemi ile tanımlanmıştır. Farklı bölgelerden selekte edilen 38 yabani vişne tipi 16 RAPD primeri kullanılarak araştırılmıştır. Kullanılan primerler 4 ile 16 arasında değişen bantlar vermiştir. Elde edilen veriler ile genetik benzerlikler hesaplanmış ve genetik benzerliklere dayalı dendrogram elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan tipler arasında iki sinonim grup olduğu belirlenmiştir. En düşük genetik benzerlik Simav-1 ile diğer 37 tip (%89) arasında bulunmuştur. En yüksek genetik benzerlik %99 ile Yenişarbademli-6 ve Yenişarbademli-7, Sultandağı-7, Sultandağı-1 tiplerinden oluşan sinonim grup arasında tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Prunus cerasus* L., Anaç, RAPD, genetik benzerlik

Molecular Characterization of Some Wild Sour Cherry (*Prunus cerasus* L.) Types by Using RAPD Technique

Abstract

In this research, it was identified with Wild Sour Cherry types which are used as rootstocks for sour cherry and sweet cherries by RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) molecular technique. Selected in different areas of the 38 wild cherry types were examined by using 16 primers of RAPD. The used primers ranged from four to seventeen bands. The data were analyzed to calculate genetic similarity values and was performed to generate a dendrogram. The types which were used in the study, two groups were determined to be synonyms. The lowest genetic similarity was evaluated between Simav-1 and 37 other types (%89). The highest genetic similarity was identified between Yenişarbademli-6 and Yenişarbademli-7, Sultandağı-7, Sultandağı-1 types (%99) of synonyms the group composed.

Key Words: *Prunus cerasus* L., rootstock, RAPD, genetic similarity

GİRİŞ

Vişnenin (*Purunus. cerasus* L.) anavatanı Hazar Denizi ile İstanbul arasındaki Kuzey Anadolu dağlarıdır [10]. 2010 yılında dünya vişne üretimi 1.172.915 tondur. Türkiye 194.989 ton ile dünyada en fazla üretime sahip ülkedir [2]. Vişne meyve üretimi yanında anaç olarak ta kullanılmaktadır. Kiraz ve vişne yetiştiriciliğinde vişne anaçları bazı durumlarda tercih edilmektedir. Özellikle ağır yapılı, tınlı, kuş kirazı ve idris için ağır topraklarda vişne anaçları iyi sonuç vermektedir [11]. Nemli ağır topraklarda performansı daha iyi olan vişne anaçlarının soğuklara dayanımı da kiraz ve idris anaçlarına göre daha iyidir [12].

Moleküler markör sistemleri günümüzde bitki ıslahı çalışmalarında kullanımı oldukça yaygın bir araç olarak yerini almıştır. PCR temelli ilk markör olan RAPD uygulaması kolay çabuk sonuç alınabilen bir tekniktir. Az miktarda DNA ile çalışma imkânı vermesi, 10

nükleotidlik primer kullanılarak DNA çoğaltımı yapılabilmesi, çalışma esnasında radyoaktif madde kullanımına gerek duyulmaması bu tekniğin olumlu yönleridir. Bu olumlu özellikleri yanında RAPD tekniği bazı olumsuz özelliklere de sahiptir ve bu özellikler analizlere başlamadan önce mutlaka bilinmelidir. Bunların başında PCR öncesi örneklerde meydana gelebilecek bulaşma, dominant özellik ve farklı laboratuarlarda sonuçların tekrarlanmasında karşılaşılan güçlüklerdir [13].

Yurt içinde ve yurtdışında vişne çeşit ve anaçlık özelliklerine yönelik moleküler karakterizasyon çalışmaları [1, 3, 6, 9] gerçekleştirilmiş, tip ve çeşitler arasındaki varyasyonların belirlenmesine yönelik araştırmalar yapılmıştır.

Bu çalışma ile kiraz-vişne yetiştiriciliğinde kullanılmak üzere, ülkemizde vişne üretiminin yapıldığı bölgelerinden anaç geliştirilmesi amacıyla selekte

edilmiş olan yabancı vişne tiplerinin aralarındaki genetik ilişki RAPD tekniği ile moleküler olarak incelenmiştir. Çalışma sayesinde tipler ile ileride yapılması planlanan köklendirme, doku kültürü ve aşı uyumsuzluk çalışmaları gibi uygulamalardan önce araştırmacılara tiplerin genetik benzerlikleriyle ilgili bilgi sağlanması amaçlanmıştır.

MATERYAL YÖNTEM

Materyal

Bu araştırma, Afyonkarahisar, Ankara, Isparta, Konya ve Kütahya illerinden selekte edilerek Meyvecilik Araştırma İstasyonu'nda kurulan anaç ıslah parseline aktarılan 38 yabancı vişne tipiyle (Çizelge 1.), Moleküler Biyoloji Laboratuvarında yürütülmüştür.

Çizelge 1. Çalışma materyalini oluşturan yabancı vişne tipleri ve alındığı iller

Afyonkara- hisar	Ankara	Isparta	Konya	Kütahya
Sultandağı 1	Ayaşlar	Harmanören	Doğanhisar 1	Simav 1
Sultandağı 2		Yenişarbademli 1	Doğanhisar 1-1	Simav 2
Sultandağı 3		Yenişarbademli 2	Doğanhisar 2	Simav 4
Sultandağı 4		Yenişarbademli 3	Doğanhisar 4	Simav 5
Sultandağı 5		Yenişarbademli 6	Doğanhisar 5	Simav 6
Sultandağı 6		Yenişarbademli 7	Doğanhisar 5	Şaphane 1
Sultandağı 7		Yenişarbademli 8	Doğanhisar 6	Şaphane 2
Sultandağı 8		Yenişarbademli 9	Doğanhisar 9	
Sultandağı 9		Yenişarbademli 10		
Sultandağı 10		Yenişarbademli 11		
Sultandağı 11				
Sultandağı 12				
Sultandağı 13				

DNA İzolasyonu

Bitki genomik DNA izolasyonu, CTAB DNA ekstraksiyon yöntemi [4] ile gerçekleştirilmiştir. İzolasyonda ilkbaharda alınan taze yaprak örnekleri kullanılmıştır. DNA kalitesi spektrofotometre ve agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuş çalışmaya uygun oldukları görülerek -20 °C' de muhafazaya alınmıştır.

PCR Aşaması

Araştırmada daha önce kullanılan [5] ve başarılı bulunan 16 primer (Çizelge 2) kullanılmıştır.

PCR karışımı 1X PCR tampon solüsyonu (50Mm KCl, 10mM Tris HCl 25 °C pH 9.0, 1% Triton X-100), 1 µl genomik DNA, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 mM dNTP, 20 pmol primer ve 2,5 ünite Fermantas Ex Taq DNA polimeraz enzimi içeren ve suülüte 25 tamamlanarak hazırlanmıştır. Hazırlanan PCR karışımı Bio-Rad C1000 Thermal Cycler PCR cihazına yerleştirilip 94 °C' de 3 dakika süreyle bir denatürasyon yapıldıktan sonra 40 döngü olacak şekilde 94°C' de 30 saniye, 38°C' de 1 dakika, 72 °C' de 1 dakika tutulmuştur. Son olarak PCR karışımı 72 °C' de 10 dakika tutularak markör çoğaltılmıştır.

PCR aşaması sonrasında elde edilen ürünlerin görüntülenmesi amacıyla % 1.5 'lik agaroz jel (Sigma Agarose) hazırlanmıştır. PCR reaksiyonlarından elde

Çizelge 2. Vişne karakterizasyon çalışmasında kullanılan RAPD primerlerin listesi

Primer	Sequence
OPG03	5' GAG CCC TCC A 3'
OPG05	5' CTG AGA CGG A 3'
OPG17	5' ACG ACC GAC A 3'
OPH04	5' GGA AGT CGC C 3'
OPN11	5' TCG CCG CAA A 3'
M2	5' GCC ACA CAC A 3'
RAPD1	5' ACG CAG GCA C 3'
P49	5' GTA CCA GTG A 3'
F04	5' GGT GAT CAG G 3'
R01	5' TGC GGG TCC T 3'
T07	5' GGC AGG CTG T 3'
U19	5' GTC AGT GCG G 3'
D07	5' TTG GCA CGG G 3'
E15	5' ACG CAC AAC C 3'
F01	5' ACG GAT CCT G 3'
U10	5' ACC TCG GCA C 3'

edilen ürünler 100 bp plus DNA büyüklük markörüyle (Fermantas) birlikte agaroz jelde ve Tris borik asit EDTA (TBE) tampon solüsyonu içerisinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılmıştır. Daha sonra ethidium bromide ile boyanıp, Kodak EL Logic 200 jel görüntüleme sisteminde ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir.

Sonuçların değerlendirilmesi

Jel elektroforezi ve görüntüleme işlemleri sonucunda elde edilen görüntülerdeki bantlar varlığında bir (1), yokluğunda sıfır (0) ve amplifikasyonun görülmediği durumlarda dokuz (9) şeklinde skor edilerek kayıt altına alınmıştır. Elde edilen veriler NTSYS (Numerical Taxonomy Multivariate Analysis System, NTSYS-pc version 2.11, Exeter Software, Setauket, N.Y. USA,) [7] bilgisayar paket programında analiz edilmiştir. UPGMA (Unweighted Pair-Group Method With Arithmetic Average) metoduna göre dendrogram elde edilmiştir. Yapılan analizlerle çalışmada kullanılan yabancı vişne tipleri arasındaki varyasyon ve benzerlik düzeyleri tespit edilerek ve genetik yapının özellikleri ortaya konulmuştur.

Her primer kombinasyonu için toplam bant sayısı (TBS), polimorfik bant sayısı (PBS) ve polimorfizm oranları (PO) belirlenmiştir [7]. Polimorfizm oranı formül (Polimorfizm Oranı (%)) = (Polimorfik Bant Sayısı / Toplam Bant Sayısı) X 100) yardımıyla bulunmuştur.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Uygulanılan 16 primerden 4-16 arasında değişen DNA bantları elde edilmiştir. OPG17, RAPD1 ve P49 primerlerinde polimorfik bant elde edilememiştir. Bant elde edilen 13 primerden 62'si polimorfik toplam 116 bant elde edilmiştir. Ayrıca bu primerlerin polimorfizm oranının da % 53,45 olduğu tespit edilmiştir. En yüksek polimorfizm oranı (%90,91) U19 primerinde, en düşük polimorfizm oranı (%16,67) ise F01 primeri ile elde edilmiştir (Çizelge 3).

Araştırmada yer alan tipler iki ana gruba ayrılmıştır (Şekil 1). Ana grubun birinde sadece Simav-1 tipinin yer aldığı, diğer 37 tipin ise başka ana grup içinde çok sayıda alt grup oluşturduğu gözlemlenmiştir. Çalışmada kullanılan tipler arasında iki sinonim grup olduğu belirlenmiştir. Dendrogram incelendiğinde en düşük genetik benzerlik Simav-1 ile diğer 37 tip (%89) arasında, en yüksek genetik benzerlik %99 ile Yenişarbademli-6 ve Yenişarbademli-7, Sultandağı-7, Sultandağı-1 tiplerinden oluşan sinonim grup arasında tespit edilmiştir.

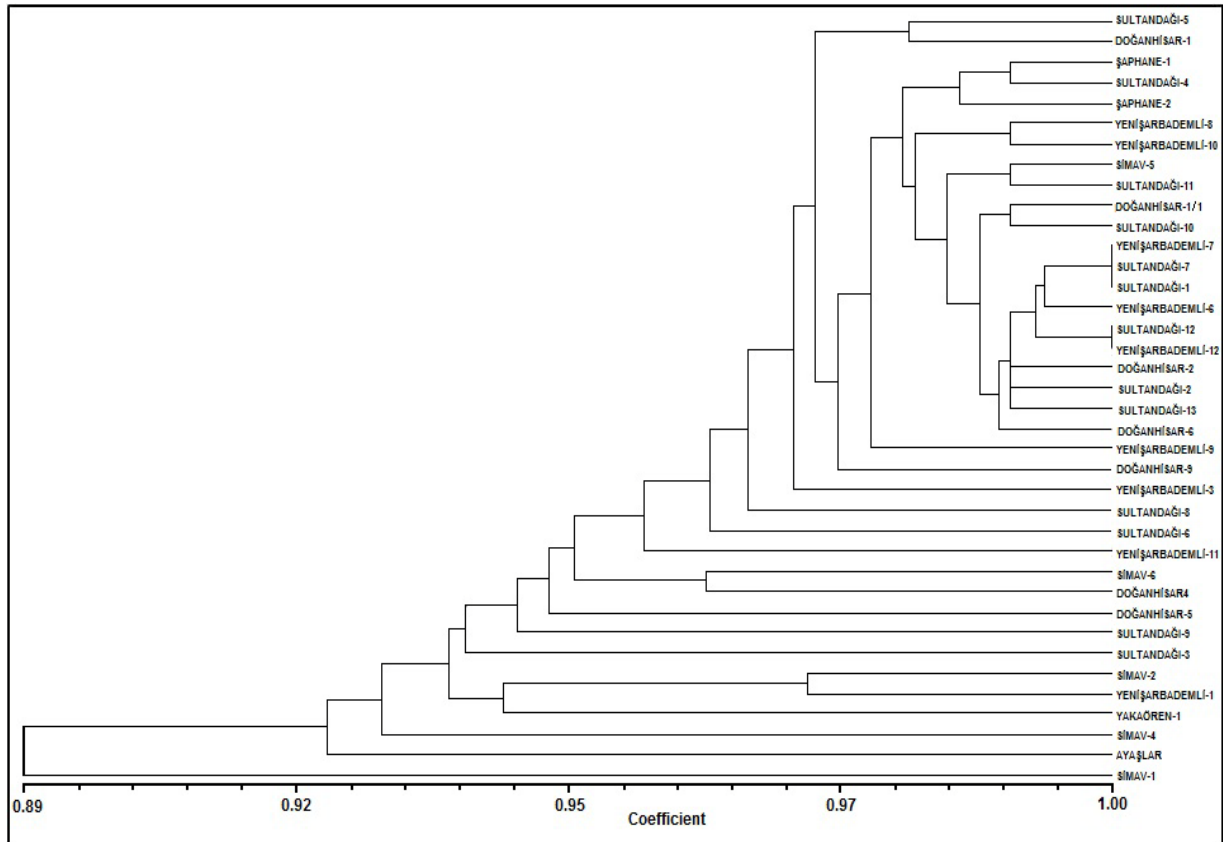
Çalışmada genetik uzaklığın coğrafi konum benzerliği ile birebir örtüşmemiştir. Örneğin Simav-1 tipi kendi coğrafi bölgesinden alınan örneklerle olan uzaklığı ile diğer tiplere olan uzaklığı aynıdır.

Çalışmada 2 sinonim grup elde edilmiştir. I. Sinonim grupta Yenişarbademli-7, Sultandağı-7, Sultandağı-1, II. Sinonim grupta Sultandağı-9, Yenişarbademli-2 tiplerinin yer aldığı görülmüştür. Araştırmada kullanılan RAPD primerleri ile bu tipler arasında genetik farklılık tespit edilememiştir. Vişne çeşit ve tiplerinin arasında daha önce yapılan moleküler karakterizasyon çalışmalarında da genetik varyasyonun düşük olduğu, hatta sinonim grupların olduğu çalışmalar [1, 3, 6, 9] mevcuttur. Çalışmamızda da tipler arasındaki varyasyonun %89 – 100 arasında değiştiği, genetik varyasyonun düşük olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3. Çalışmada kullanılan RAPD primerleri için Bant Uzunluk Aralıkları (bp), Toplam Bant Sayısı (TBS), Polimorfik Bant Sayısı (PBS), Polimorfizm Oranı (PO)

RAPD Primer	Bant Uzunluk Aralıkları (bp)	TBS	PBS	PO(%)
OPG03	300-2700	16	5	31,25
OPG05	200-2800	14	6	42,86
OPG17	700-2000	5	0	0,00
OPH04	600-2800	10	9	90,00
OPN11	350-2000	7	2	28,57
M2	180-1000	7	4	57,14
RAPD1	500-1200	5	0	0,00
P49	200-650	4	0	0,00
F04	400-1400	5	4	80,00
R01	400-2100	8	5	62,50
T07	400-1500	9	3	33,33
U19	250-2500	11	10	90,91
D07	200-1500	7	5	71,43
E15	290-950	4	3	75,00
F01	300-1200	6	1	16,67
U10	100-2200	12	5	41,67
TOPLAM*		116	62	53,45

*: Polimorfik bant gösteren primerler dikkate alınmıştır.



Şekil 1. Bazı yabancı vişne tiplerinin RAPD analizleri sonucu elde edilen dendrogram

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma ile yeni anaç geliştirilmesi amacıyla ülkemizin vişne üretiminin yoğun olarak yapıldığı bölgelerden selekte edilen yabani vişne tiplerinin genetik ilişkileri RAPD markörleri ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, tipler arasındaki genetik benzerliğin yakın olduğu, tiplerin coğrafi konum benzerlikleri ile genetik ilişkilerinin arasında bir doğrusal bir oran olmadığı görülmüştür.

Yapılan çalışma materyaller ile ilgili yapılacak ıslah ve moleküler çalışmalara alt yapı oluşturacaktır. Halen devam eden seleksiyon projesi için tiplerin genetik ilişkileri hakkında ıslahçılara yeni veriler oluşturulmuştur. Yabani vişne tipleri ile daha fazla moleküler çalışma yapılması ile iş gücü ve zaman tasarrufu, tiplerin özellikleri ile ilgili daha fazla bilgi, amaçlanan ıslah kriterlerine odaklanma sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

[1] Aka-Kaçar, Y. ve S. Çetiner, 2001. "RAPD Analizleri ile Bazı Kiraz (*Prunus avium* L.) ve Vişne (*Prunus cerasus* L.) Çeşitlerinin Moleküler Genetik Yapılarının Belirlenmesi", I. Sert Çekirdekli Meyveler Sempozyumu, 115-122, Yalova.

[2] Anonim, 2012. Food and Agriculture Organization of the United Nations. www.fao.org. Erişim Tarihi : 27.01.2012.

[3] Cantini, C., A. F. Iezzoni, W. Lamboy, M. Boritzki, D. Struss, 2001. DNA fingerprinting of tetraploid cherry germplasm using simple sequence repeats. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 126, 205-209.

[4] Doyle, J.J., J. L. Doyle, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus.12:13-15.

[5] Kaymak, S., 2012. Türkiye'de Elma Kara Lekesi Hastalığı *Venturia Inaequalis* 'ın Irklarının Tespiti, Moleküler Karakterizasyonu ve Patojenisitelerinin Belirlenmesi (Sonuç Raporu), Proje No: TAGEM-BS-09/04-06, s: 116, Isparta.

[6] Pedersen, B. H., 2006. DNA fingerprints of 51 sweet and sour *Prunus* accessions using simple sequence repeats. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 81(1), 118-124.

[7] Rohlf, F. J. 2000. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Software, Setauket, NY.

[8] Smith, J.S.C., E. C. L. Chin, H. Shu, O. S. Smith, S. J. Wall, M. L. Senior, S. E. Mitchel, S. Kresovich, J. Tiegle, 1997. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPS and pedigree. Theor. Appl. Genet. 95: 163-173.

[9] Türkoğlu Çelik, Z., 2009. Ordu İlinden Selekte Edilen Kiraz-Visne Anaç Adayı Bitkilerin morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonu. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı (Doktora Tezi), SAMSUN.

[10] Özbek, S., 1978. Özel Meyvecilik Ç.Ü.Z.F. Yayınları 128. Ders Kitabı:11,A.Ü. Basımevi, Ankara, 487, s.

[11] Özçağırın, R., A. Ünal, E. Özeker ve M. İsfendeiyaroğlu, 2005. Ilıman İklim Meyve Tırları . Sert Çekirdekli Meyveler. Cilt, I. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.

[12] Webster, A.B.D., 1980. Drawing rootstocks for plums and cherries, Acta Hort., 114, 103.

[13] Williams, J.G.K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, S. V. Tingey, 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. Nucleic Acids Res., 18, 6531-6535.