

Farklı yamula patlıcanı genotiplerinin genetik benzerliklerinin ISSR moleküler markır yardımıyla belirlenmesi

Hasan PINAR¹, Ömer Faruk COŞKUN¹, Emrah UYSAL¹, Osman GÜLŞEN¹, Halit YETİŞİR¹

¹Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, KAYSERİ

Alınış tarihi: 14 Ekim 2016, Kabul tarihi: 19 Ocak 2016

Sorumlu yazar: Ömer Faruk COŞKUN, e-posta:ofcoskun1@hotmail.com

Öz

Yamula patlıcanı kendine özgü çizgili yapısı, sert meyve eti gibi özellikleri ile ön plana çıkmakta olup, özellikle yetiştirildiği bölgedeki insanlar tarafından kurutmalık, taze tüketim ve salamura olarak farklı şekillerde tüketilmektedir. Pazarlanabilir ürün için üniform meyve, hastalık ve zararlılara dayanımlı ve aynı zamanda verimli genotipler en önemli unsurdur. Fakat Yamula patlıcanında üreticiler kendi elde ettikleri standart tohumlarla üretim yaptıklarından dolayı genetik farklılık kaçınılmaz olmuştur. Bu amaçla Kayseri yöresinden seçilen farklı meyve tiplerine sahip 10 adet Yamula patlıcanı genotipi ile 1 adet Manisa patlıcanı ve 1 adet Anamur tipi hibrit patlıcan çeşidinin genetik benzerlik/farklılıkları ISSR markırları ile belirlenmiştir. 12 patlıcan genotipinde 15 ISSR primeri ile yürütülen çalışma ile 8 primerde polimorfizm elde edilmiştir. Primer başına ortalama 8.47 bant elde edilirken toplam bant sayısı 127 ve polimorfizm oranı %21.3 olarak belirlenmiştir. Skorlanan bantlardan elde edilen UPGMA dendrogramına göre tüm genotipler arasındaki genetik benzerlik %94 olarak tespit edilmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgular farklı meyve tiplerine göre seçilen 10 adet Yamula patlıcanı genotipleri arasında genetik farklılığın olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Yamula patlıcanı, ISSR, moleküler karakterizasyon

Determination of genetic similarity of different yamula eggplant genotypes via ISSR molecular markers

Abstract

Yamula eggplant cultivar forefront with specific striped structure and hard fruit flesh, especially it was consumed by have lived people at its growing regions as fresh, dried and pickled. Uniform fruit, disease resistance and high yielded genotypes are the most important factor for marketable products. But, it is inevitable genetic differences because of producing with obtained seeds yourself. In this study, it was aimed to determine genetic similarities/differences of 12 eggplant genotypes (10 of them selected yamula genotypes from Kayseri region) and 1 Manisa eggplant cultivar, also 1 Anamur eggplant F1 cultivar via ISSR markers. 15 ISSR primers were used using 12 eggplant genotypes and polymorphism was obtained with 8 primers. Total band number was 127 and average 8.47 band were obtained from per primer, polymorphism ratio was 21.3%. Genetic similarity was found as 94% as obtained UPGMA dendrogram after band scoring. Obtained results showed that there are genetic differences among selected as different fruit types 10 Yamula eggplant genotypes.

Key words: Yamula eggplant, ISSR, molecular characterization

Giriş

Patlıcan (*Solanum melongena* L.) ($2n=24$) tropik ve ılıman bölgelerde yetiştirilen önemli bir sebzedir. Çin, Hindistan ve Tayland'da kültüre alınmıştır, ardından önce Batı ve Kuzey Afrika'ya, 17. yüzyıl başlarında da Avrupa'ya taşınmıştır (Daunay ve ark., 2001). Ülkemize girişi tam olarak bilinmemektedir. Solanaceae familyası üyesi olan patlıcan (*Solanum melongena* L.) ülkemizde en fazla yetiştiriciliği yapılan yazlık sebzelerdendir. Patlıcan, vitamin ve mineral içeriği bakımından önemli olduğu için pek çok ülkede büyük bir ekonomik değere sahiptir (Boyacı, 2007). Subtropik bölgelerde açıkta ve örtü altında yaygın olarak yetiştirilmektedir (Mutlu ve ark., 2008). Dünyadaki en önemli patlıcan yetiştirici ülkeler: Çin, Hindistan, Mısır ve Türkiye'dir. 790 bin ton üretimi ile ülkemiz dünya üretiminin yaklaşık %2'sini karşılamaktadır (FAO, 2014). Ülkemizde Akdeniz, Güneydoğu Anadolu, Ege ve Marmara başta olmak üzere bütün bölgelerde yetiştiricilik yapılmaktadır.

Ülkemizde önceleri açık arazilerde yapılan patlıcan yetiştiriciliği günümüzde seralarda da yapılmaktadır. Örtü altı yetiştiriciliği bakımından domates, biber ve hıyardan sonra dördüncü sırada yer almaktadır. Akdeniz bölgesinde yapılan üretim daha çok örtüaltında yapılırken diğer bölgelerde açıkta yapılmaktadır. Sera üretimlerine Halkapınar, Halep, Göl ve Kemer gibi yerli çeşitlerle başlanmıştır. Daha sonra verim ve meyve kalitesindeki üstünlükleri olduğu için F1 hibrit çeşitlerine yönelinmiştir.

Bitkisel üretimin devamlı halde tutulabilmesi için tarımı yapılan türlere ait bitki genetik kaynaklarındaki çeşitliliğin korunması gerekmektedir (Tan ve İnal, 2003). Ancak, bitkisel çeşitliliğin azalması ya da kaybolmasına neden olabilecek bazı etmenler (yangın, erozyon gibi tabii afetler, arazi açmalarındaki artış, şehirleşme ve imar çalışmaları, tarımsal sistemlerin değişmesi ve tarımsal mücadele uygulamaları) bulunmaktadır. Bu nedenle birçok ülkede bitkisel kaynakların tesbiti, korunması ve saklanması yönelik çalışmalar başlatılmıştır (Tan, 1992).

Bu genetik kaynaklardan en önemlilerinden birisi ise Kayseri ili ve çevresinde yetiştiriciliği yapılan Yamula patlıcanı olarak adlandırılan standart patlıcan çeşididir. Orta Anadolu Bölgesinde (Kırıkkale, Aksaray, Niğde, Nevşehir, Kırşehir, Kayseri, Sivas, Yozgat) toplam patlıcan üretim alanı 4.186 da ve üretim miktarı ise 8.884 ton, Kayseri ilinin patlıcan üretimi ise 1.036 da alanda 2.916 tondur (TUIK,

2014). Özellikle Kayseri ve civarı illerin patlıcan üretimini Yamula patlıcanı oluşturmaktadır. Yamula patlıcanı kendine özgü çizgili yapısı, sert meyve eti gibi özellikleri ile ön plana çıkmakta özellikle yetiştirildiği bölgedeki insanlar tarafından kurutmalık, taze tüketim ve salamura olarak farklı şekillerde tüketilmektedir. Ancak üretim, üreticilerin kendi tohumlarını kendilerinin elde etmesiyle yapıldığından verimlilik giderek azalırken, hastalıklara hassasiyet, üretim bölgelerine yeni hastalık ve zararlıların girmesiyle üretimi kısıtlanmaya başlamıştır. Aynı zamanda pazar ve marketlerde üniform olmayan meyve boyu ve rengine sıkça rastlanmaktadır. Söz konusu yöresel genotipin seleksiyon ıslahı metoduyla ıslah edilerek adına doğru, üniform, kaliteli ve verimli genotiplerle üretimin yapılması en doğru metod olarak karşımıza çıkmaktadır. Islah çalışmalarının ilk adımı seleksiyon ve ardından karakterizasyondur.

Bu çalışmada Kayseri ili Yamula patlıcanı üretim alanlarından bitkisel ve meyve özellikleri dikkate alınarak seçilen 10 adet Yamula patlıcanı genotipinin genetik benzerlik ve farklılıkları ISSR moleküler markör yöntemiyle belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Çalışmada bitkisel materyal olarak Kayseri ilinden bitkisel ve meyve özellikleri dikkate alınarak seçilen toplam 10 adet Yamula patlıcanı genotipi kullanılmıştır. Ayrıca 1 adet Manisa patlıcanı genotipi ve 1 adet Anamur patlıcanı genotipi dahil edilerek 12 genotiple çalışılmıştır. Her genotipten alınan tohumlar 3:1 torf:perlit ortamında çimlendirilmiş ve iki yapraklı aşamaya geldiğinde seraya transfer edilmiştir.

DNA izolasyonu

Serada 12 adet patlıcan genotipi ekilmiş ve her genotipten taze yaprak örnekleri DNA ekstraksiyonu için liyofilize edilmiştir. Toplam genomik DNA Doyle ve Doyle (1990) protokolüne göre elde edilmiştir. DNA kalitesi spektrofotometre ve agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiş ve çalışmaya uygun oldukları görülmüştür.

PCR aşaması

Çalışmada ön testleme sonucunda başarılı bulunan 15 ISSR primeri kullanılmıştır. PCR reaksiyonu için hacim 15 µl olarak hazırlanmıştır. Her örnekte PCR reaksiyonu şu şekilde hazırlanmıştır: 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM dNTPs, 1 unit Taq DNA polymerase (GibcoBRL, NY, USA), 1 × PCR buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl), 1 M primer ve 25 ng genomik

DNA. PCR işlemi temocycerda model PTC 200 (MJ Research, Watertown, MA, USA) yapılmıştır. ISSR programı:

Ön denatürasyon için 94°C'de 2 dk, 40 döngü olacak şekilde PCR: 1 dk 94°C denatürasyon, 1 dk primer spesifik yapışma sıcaklığı (40–60°C), 2 dk 72°C uzama aşaması ve son olarak 7 dk at 72°C son uzama. ISSR PCR reaksiyonları en az iki kez test edilmiştir. PCR ürünleri etidyum bromid eklendikten sonra agaroz jelde (%1.8) yürütülmüş ve daha sonra UV ışık altında fotoğraflanmıştır.

Sonuçların değerlendirilmesi

Jel elektroforezi ve görüntüleme işlemleri sonucunda elde edilen görüntülerdeki bantlar skorlanarak kayıt altına alınmıştır. Elde edilen veriler NTSYS paket programında analiz edilmiştir ve UPGMA metoduna göre dendrogram elde edilmiştir. Yapılan analizlerle çalışmada kullanılan patlıcan tipleri arasındaki varyasyon ve benzerlik düzeyleri tespit edilerek genetik yapının özellikleri ortaya konulmuştur. Her primer kombinasyonu için toplam bant sayısı (TBS), polimorfik bant sayısı (PBS) ve polimorfizm oranları (PO) belirlenmiştir.



Şekil 1: Yamula Patlıcanı bitkisine ait arazi görüntüleri.



Şekil 2: Yamula Patlıcanı meyve görüntüleri.

Bulgular ve Tartışma

12 patlıcan genotipinde 15 ISSR primeri ile yapılan çalışma sonunda 8 primerde polimorfizm elde edilmiştir. Toplam bant sayısı 127, primer başına ortalama 8.47 bant ve polimorfizm oranı %21,3

olarak belirlenmiştir (Çizelge 1). Elde edilen UPGMA dendrogramına göre tüm genotiplerde benzerlik oranı %94 olarak tespit edilmiştir. Birbirine en yakın 5. ve 8. genotipler tespit edilmiştir (Şekil 3). İki ana küme olduğu, ilk kümede 9, diğer kümede ise 3 genotipin (2, 11, 12) yer aldığı belirlenmiştir.

Çizelge 1. 15 adet ISSR primeri ile elde edilen bant sayısı, polimorfikband ve polimorfizm oranı (%)

No	ISSR Primeri	Band Sayısı	Polimorfik Band Sayısı	Polimorfizm (%)
1	CAC3GC	11	7	64
2	CAC6	10	2	20
3	HVHTCC7	8	4	50
4	CA6AC	11	3	27
5	AG8T	11	0	0
6	CA8R	3	0	0
7	VHVG7G7	6	3	50
8	CT8TG	6	0	0
9	GACA4	10	0	0
10	HVHCA7	12	2	17
11	AG7YC	6	0	0
12	AGC6G	8	0	0
13	GAA6	9	0	0
14	TAA8GT6GG	8	3	37.5
15	TCC5RY	8	3	37.5
TOPLAM		127	27	21.3

Çizelge 2. 15 ISSR primeri ile elde edilen 12 patlıcan genotipi arasındaki benzerlik katsayıları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	1.00											
2	0.93	1.00										
3	0.97	0.95	1.00									
4	0.97	0.94	0.99	1.00								
5	0.97	0.95	1.00	0.99	1.00							
6	0.94	0.90	0.95	0.96	0.95	1.00						
7	0.95	0.94	0.99	0.97	0.98	0.96	1.00					
8	0.97	0.94	0.99	0.99	1.00	0.95	0.99	1.00				
9	0.97	0.94	0.99	0.99	0.99	0.96	0.99	0.98	1.00			
10	0.96	0.94	0.99	0.97	0.98	0.96	0.98	0.99	0.98	1.00		
11	0.94	0.98	0.96	0.95	0.95	0.92	0.95	0.95	0.96	0.95	1.00	
12	0.92	0.94	0.94	0.92	0.93	0.92	0.94	0.93	0.93	0.93	0.95	1.00

Patlıcan genotiplerinde moleküler karakterizasyon çalışmaları amacıyla farklı moleküler markir teknikleri kullanılmıştır. Patlıcanın genotipleri arasındaki genetik farklılık ve akrabalıkları ile ilgili olarak önceden RAPD (Singh ve ark., 2006; Tiwari ve ark., 2009), AFLP (Prohens ve ark., 2005), ISSR (Isshiki ve ark., 2008; Ali ve ark. 2011), SRAP (Li ve ark., 2010), SSR (Munoz-Falcon ve ark., 2011; Demir ve ark., 2010; Stagel ve ark., 2008; Behera ve ark., 2006; Nunome ve ark., 2003) moleküler markirleri kullanılmıştır. Isshiki ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ISSR primerlerini kullanarak 8 patlıcan genotipini karşılaştırmışlardır. Çalışma sonunda ISSR primerlerinin yüksek polimorfizm gösterdikleri için patlıcanda genetik haritalama çalışmalarında kullanılabilirliği belirtilmektedir (Isshiki ve ark., 2008). 143 patlıcan genotipi ile yapılan başka bir çalışmada genetik çeşitliliğin tanımlanmasında ISSR markirlerinin, RAPD markirlerinden daha etkili olduğu belirlenmiştir (Ali ve ark., 2011). 56 adet patlıcan genotipinde yapılan analizde 55 adet SRAP primer kombinasyonu kullanılmıştır (Live ark., 2010). 19 patlıcan genotipinin moleküler karakterizasyonu çalışmasında kullanılan 29 RAPD primeri kullanılmıştır (Tiwari ve ark., 2009). Ali ve ark. (2011), tarafından yapılan bir çalışmada Çin orijinli patlıcanlarda ISSR ve RAPD teknikleri kullanılarak bitki çeşitliliği araştırılmıştır. SSR ve RAPD markirleri kullanılarak, Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanmış patlıcan genotiplerinin moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. 11 RAPD primeri ile yürütülen çalışmada ise 100 banttan 29'unda polimorfizm gözlenmiş, en fazla polimorfik bant üreten primerin % 64 ile opb07 primeri olduğu belirlenmiştir. (Demir ve ark., 2010). 70 farklı coğrafi bölgeden temin edilen scarlet patlıcanlar (*Solanum aethiopicum* L.) arasındaki genetik çeşitliliğin araştırıldığı çalışmada, AFLP ve SSR analizleri ile genotiplerin genetik ilişkileri araştırılmıştır. AFLP ve SSR verilerinin genetik benzerlik matris dendrogramlarında Güney Amerika ve İtalya'dan toplanan genotiplerinin varyasyon oluşturduğu gözlenmiştir (Sunseri ve ark., 2010). Çalışmada kullanılan 11 nolu genotip Manisa patlıcanı olarak üretimi yapılan standart çeşittir. Söz konusu çeşit daha çok Yamula patlıcanına benzemekle birlikte (çizgililik), meyve şekli bakımından (ince uzun) farklılık arz etmektedir. 12 nolu genotip ise Anamur tipi patlıcan olup hem Manisa hem de Yamula patlıcanı genotiplerinden farklı meyve ve bitki tipine sahiptir. Bu çalışmada hem Manisa hem de Anamur

tipi patlıcan ayrı grupta yer almışlardır. Fakat Manisa patlıcanı (11 numaralı) daha çok Yamula patlıcanına genetik olarak daha benzer bulunmuştur.

Sonuç ve Öneriler

Çalışmadan elde edilen bulgular Yamula patlıcanı genotipleri arasında genetik benzerlik yüksek (0.96) olmasına rağmen Yamula patlıcanı ile Manisa patlıcanı ve Anamur patlıcanı arasındaki genetik benzerliğin daha düşük (0.94) olduğunu göstermektedir. Elde edilen varyasyon hem standart Yamula patlıcanı geliştirilmesinde hem de diğer amaçlar için hazırlanacak patlıcan ıslahı programlarında kullanılabilir niteliktedir. Ayrıca bu çalışmada kullanılan ISSR moleküler markir tekniğinin çeşitler içinde ve çeşitler arasında genetik benzerlik veya farklılığın belirlenmesinde başarılı bir şekilde kullanılabilirliği göstermektedir.

Kaynaklar

- Ali, Z., Xu, Z.L., Zhang, D.Y., He, X.L., Bahadur, S., Yi, J.X. 2011. Molecular Diversity Analysis of Eggplant (*Solanum melongena*) Genetic Resources, Genetics and Molecular Research, 10 (2):1141-1155.
- Behera, T., Sharma, P., Singh, B., Kumar, G., Kumar, R., Mohapatra, T., Singh, N. 2006. Assessment of genetic diversity and species relationships in eggplant (*Solanum melongena* L.) using STMS markers. Scientia Horticulturae, 107:352-357.
- Boyacı, H.F. 2007. Patlıcanlarda *Fusarium* solgunluğuna dayanıklılık kaynakları ve dayanıklılığın kalıtımı. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Adana.
- Daunay, M.C., Janick, J. 2007. History and Iconography of Eggplant. Chronica Horticulturae 47(3):16-22.
- Demir, K., Bakır, M., Sarıkamış, G., Acunalp, S. 2010. Genetic Diversity of Eggplant (*Solanum melongena*) Germplasm from Turkey Assessed by SSR and RAPD Markers, Genetics and Molecular Research, 9(3):1568-1576.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1990. Isolation of Plant DNA from fresh tissue. Focus. 12: 13-15.
- FAOSTAD Statistical Databases [http://www.fao.org/] 2014.
- Isshiki, S., Iwata, N., Khan, M.M.R. 2008. ISSR variations in eggplant (*Solanum melongena* L.) and related *Solanum* species. Scientia Horticulturae, 117:186-190.
- Li, H., Chen, H., Zhuang, T., Chen, J. 2010. Analysis of genetic variation in eggplant and related *Solanum* species

- using sequence-related amplified polymorphism markers, *Scientia Horticulturae*, 125 (1):19-24.
- Munoz-Falcón, J.E., Vilanova, S., Plazas, M., Prohens, J. 2011. Diversity, relationships, and genetic fingerprinting of the Listada de Gandía eggplant landrace using genomic SSRs and EST-SSRs. *Scientia Horticulturae* 129:238-246.
- Mutlu, N., Boyacı, F.H., Göçmen, M., Abak, K. 2008. Development of SRAP, SRAP-RGA, RAPD and SCAR markers linked with a *Fusarium* wilt resistance gene in eggplant. *Theor Appl Genet.* 117:1303-1312.
- Nunome, T., Suwabe, K., Iketani, H., Hirai, M. 2003. Identification and characterization of microsatellites in eggplant. *Plant Breeding*, 122:256-262.
- Prohens, J., Blanca, J.M., Nuez, F. 2005. Morphological and molecular variation in a collection of eggplants from a secondary center of diversity: implications for conservation and breeding. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130:54-64.
- Singh, A., Singh, M., Singh, R., Kumar, S., Kaloo, G. 2006. Genetic diversity within the genus (*Solanaceae*) as revealed by RAPD markers. *Current science*, 90:711-716.
- Stagel, A., Portis, E., Toppino, L., Rotino, G.L., Lanteri, S. 2008. Gene-based microsatellite development for mapping and phylogeny studies in eggplant. *BMC genomics*, 357-370.
- Sunseri, F., Polignano, G.B., Alba, V., Lotti, C., Bisignano, V., Mennella, G., D'Alessandro, A., Bacchi, M., Riccardi, P., Fiore, M.C., Ricciardi, L. 2010. Genetic Diversity and Characterization of African Eggplant Germplasm Collection, *African Journal of Plant Science*, 4(7):231-241.
- Tan, A. 1992. Türkiye' de bitkisel çeşitlilik ve bitki genetik kaynakları. *Anadolu, J. of AARI.* 2(2): 50-54.
- Tan, A., İnal, A. 2003. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü bitki genetik kaynakları çalışmaları, *Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayın No:112, 13s.*
- Tiwari, S.K., Karihaloo, J.L., Nowsheen, H., Gaikwad, A.B. 2009. Molecular Characterization of Brinjal (*Solanum melongena* L.) Cultivars Using RAPD and ISSR Markers, *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 18 (2):189-195.
- TUİK, 2014. Bitkisel Üretim İstatistikleri. <http://www.tuik.gov.tr/>.