

CEVİZ ISLAHINDA BİYOTEKNOLOJİNİN KULLANIMI

Akife DALDA ŞEKERCİ¹

Mehmet YAMAN¹

Ahmet SAY²

ÖZET

Tüm dünyada yetiştiriciliği yapılan ceviz çeşitleri şans çöğürlerinden veya ıslah programlarından meydana gelmiştir. Bu çeşitlerin karakterize edilmesi ıslahçılar için oldukça önemlidir. Ceviz ağaçlarının son yıllara kadar tamamen tohumdan aşısız olarak üretilmesi, ülkemizin geniş bir ceviz popülasyonuna sahip olmasına neden olmuştur. Genetik açımdan dolayı her bir ceviz ağacı bir çeşit ya da genotip durumundadır. Bu durum ıslah açısından önem arz etmesine karşın, birörnek bitki sağlama bakımından olumsuz bir durumdur. Ek olarak, çeşitlerin ismine doğru olarak kısa zamanda tanımlanması meyvecilikte oldukça önemlidir. Ancak genetik çeşitliliği karakterize etmek için kullanılan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal yöntemler çevresel faktörlerden etkilenmekte ve uzun zaman almaktadır. Biyoteknolojinin kullanımı ile bu olumsuz durumun üstesinden gelinebilmektedir. DNA markör teknikleri ile farklı ekolojideki genetik materyallerin karakterize edilmesine olanak sağlanmaktadır. Cevizlerde moleküler markör teknikleri ceviz türlerinin sınıflandırılmasına, ceviz çeşitlerinin karakterizasyonuna, genetik haritalama çalışmalarına, melez bitkilerin belirlenmesine ve genetik haritaların oluşturulmasına olanak sağlamaktadır. Bu durum ülkemizdeki ceviz yetiştiriciliği ve ıslahı için oldukça önemlidir. Bu çalışmada cevizde şimdiye kadar yapılmış olan biyoteknolojik çalışmalar göz önüne alınarak biyoteknolojinin ceviz ıslahında kullanım olanakları hakkında bilgi vermek amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ceviz, biyoteknoloji, moleküler, markör

SUMMARY

USAGE OF BYOTECHNOLOGY ON WALNUT BREEDING

All varieties of walnut cultivation has occurred in the world of the chance seedling or breeding programs. The characterization of this kind is very important for breeders. To be produced entirely from non-grafted walnut tree seed until recent years, it has led to having a large walnut population of our country. Due to genetic evolution, each walnut tree is a variety or genotype. Although this situation has not important for breeding, it is a negative situation in terms of providing uniform plants. In addition, the identification of varieties in a short time is very important in fruit production. However, that is used to characterize the genetic diversity of morphological, physiological and biochemical methods are influenced by environmental factors, and it takes a long time. With the use of biotechnology can point to overcome this adverse situation. DNA marker techniques are provided to allow the characterization of the genetic material in different ecology. The use of molecular marker techniques in walnut, walnut species classification, the characterization of walnut varieties, genetic mapping studies, enabling the identification of

¹ Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Biyosistem Mühendisliği Bölümü, KAYSERİ

² Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, KAYSERİ

hybrid plants and genetic maps to be created. This is very important for walnut production and breeding in our country. In this study, which is made of walnut so far biotechnological studies intended to provide information about the use of biotechnology, taking into account the possibilities of walnut breeding.

Keywords: Walnut, biotechnology, molecular marker

GİRİŞ

Ceviz, *Dicotyledoneae* sınıfı, *Juglandales* takımı, *Juglandaceae* familyasının *Juglans* cinsine ait sert kabuklu bir meyve türüdür [1]. *Juglans* cinsi içerisinde 21 kadar tür kuruyemiş ve kereste olarak ekonomik öneme sahiptir, çoğunlukla *Juglans regia*'nin kültürü ve ticareti yapılmaktadır [2, 3, 4]. *Juglans regia*, Doğu Avrupa ve Türkiye, Irak, İran'ın doğusundan Himalaya dağlarının ötesinde kalan ülkeleri içeren geniş bir alanın doğal bitkisidir [1]. *J. regia*'nin anavatanlarından biri olan Türkiye'nin yıllık ceviz üretimi 2014 TÜİK verilerine göre 180.807 tondur [5]. Tüm dünyada yetiştiriciliği yapılan ceviz çeşitleri şans çöğürlerinden veya ıslah programlarından meydana gelmiştir. Bu çeşitlerin karakterize edilmesi ıslahçılar için oldukça önemlidir. Türkiye'nin 2014 yılı itibarıyla meyve veren ve meyve vermeyen toplam ceviz ağacı sayısı 7 milyon dolayında olup bunların büyük bir kısmı tohumdan çıkmıştır ve genetik açılamdan dolayı her bir ceviz ağacı bir çeşit ya da genotip durumundadır. Bu durum ıslah açısından çok önemli olmasına karşın, bir örnek bitki sağlama bakımından olumsuz bir durumdur [4]. Ayrıca çeşitlerin ismine doğru olarak kısa bir süre içerisinde tanımlanması meyvecilikte çok önemlidir. Ancak genetik çeşitliliği karakterize etmek için başvuru morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal yöntemler uzun zaman almakta ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Bunların yanı sıra günümüzde ticari öneme sahip olan genotipler çoğunlukla vegetatif olarak çoğaltılmaktadır. Bazı önemli özellikler çevre koşullarının da etkisi ile çoğaltım sırasında kaybolarak görülemeye bilmektedir. Bu nedenle, genetik çeşitlilik ve ceviz genotiplerimizin genetik yapısının değerlendirilmesi ve koruma altına alınması, gelecekte yapılacak olan ıslah programları için çok önemli olabilir. Ek olarak var olan ceviz gen havuzumuzun potansiyeli hakkında temel genetik bilgi sağlamak için, ıslah materyalleri arasındaki genetik ilişkiyi ve genetik

çeşitliliği bilmek yeni geliştirilecek olan stratejiler için önem arz etmektedir.

Dolayısı ile ceviz gen kaynağının içerisinde yer alan genotipler arasında genetik ilişkiyi ve genetik varyasyonu belirleme gen kaynaklarının verimli bir şekilde kullanımını etkileyecek önemli bir konudur. DNA markör teknikleri ile farklı ekolojilerdeki genetik materyallerin karakterize edilmesi sağlanmaktadır. Moleküler markır yöntemleri kullanarak ceviz genetik materyalleri karakterize etmek ve ıslah amaçlı genotipler arasındaki genetik ilişkileri tespit etmek önemlidir. Araştırmacılarda, geleneksel ıslah metotları yerine, moleküler markır teknikleri üzerine odaklanmaya başlamışlardır. EUROGENE (European Forest Genetic Resources Programme = Avrupa Orman Genetik Kaynakları Programı) Ceviz genetik kaynaklarının toplanması ile ilgili olmasına rağmen, genetik ilişkilerin belirlenmesiyle ilgili çalışmaların eksikliği, çalışmalarını kısıtlamaktadır. Ceviz genotipleri ve fenotipik özellikleri arasındaki genetik ilişkilere ait bilgiler ceviz ıslah programlarında çok yararlı olacaktır.

Bunlara ek olarak dayanıklılık ıslahında biyoteknolojinin kullanımı da önemli çalışma konularından biridir. Cevizde *Colletotrichum gloeosporioides*'in sebep olduğu antraknos da önemli ceviz hastalıklarından biridir ve üretimde ciddi kayıplara sebep olmaktadır [6]. Hastalığın kontrolünde kimyasal uygulamaları ile mücadele yapılabilmekte ancak bu da çevresel faktörler ve patojenlerin ilaca olan dayanıklılığı ile kısıtlanabilmektedir [7, 8]. Bu yüzden dayanıklılık ıslahı kaçınılmazdır. Dayanıklılık genleri ile bağlantılı olan genetik markırlar ıslahın etkinliğini arttırmaktadır. Genetik markırların geliştirilmesi ile cevizen izole edilen dayanıklı genler vasıtasıyla antraknos için dayanıklılık ıslah programları geliştirilebilir [9].

Cevizde Biyoteknolojinin Kullanımı

Bugüne kadar ceviz çeşitlerinin tanımlanmasında genellikle biyokimyasal [10, 11]

yöntemler kullanılmaktaydı ancak son yıllarda DNA markörleri kullanılmaya başlanmıştır. Bitkilerde genetik ilişkileri ortaya çıkarmak için kullanılan ilk DNA markörü RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) olmuştur. Fakat bu yöntemin maliyetinin çok yüksek ve yavaş olması PCR'a (Polymerase Chain Reaction) dayalı moleküler markörlerin gelişmesine neden olmuştur. Bu markörlerin bazıları RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) ve mikrosatellitlerdir. Cevizlerde de moleküler markör tekniklerinden ilk olarak RFLP yöntemi kullanılmıştır. RFLP tekniği ceviz türlerinin sınıflandırılmasında, ceviz çeşitlerinin karakterizasyonunda ve genetik haritalama çalışmalarında [12], RAPD yöntemi de melez bitkilerin belirlenmesinde [13] ve genetik haritaların oluşturulmasında [14] kullanılmıştır. Bunların yanında *Juglans nigra*'nın genomik kütüphanesinden mikrosatellit (SSR) primerler de geliştirilmiş [15] ve *J. regia*'da polimorfizm bakımından test edilmişlerdir [16, 17, 18].

Genetik çeşitliliği belirlemek için birçok teknik uygulanabilir. Yapılan bazı çalışmaların örnekleri şu şekildedir; isozymes [19, 13, 20, 21, 10]. RFLP markır yöntemi çalışmaları [12, 10], RAPD moleküler markır çalışmaları [22, 23, 24], ISSR moleküler markır çalışmaları [25, 26], AFLP moleküler markır çalışmaları [27, 28] SNP'ler [29] ve SSR moleküler markır çalışmaları [30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43] şimdiye kadar yapılan çalışmalara örnek gösterilebilir. Yukarıda belirtilen RFLP, RAPD ISSR ve SSR yöntemleri kullanılarak ceviz çeşitlerinin karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar, gen kaynaklarında bulunan tüm ceviz çeşitleri genetik olarak tanımlamaya olanak sağlamaktadır. Ülkemizde ceviz genotiplerinin moleküler karakterizasyonu ile ilgili ilk çalışma Kafkas ve ark. Tarafından [44] AFLP ve SAMPL teknikleri kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmada 21 ceviz genotipi kullanılmıştır. Ancak, böyle bir çalışmanın ülkemiz genetik kaynaklarında bulunan önemli tüm ceviz genotipleri için yapılması gerekmektedir. Yapılan bu çalışmalar çeşitlerin genetik yapılarının doğru şekilde belirlenerek, babalık ve soyağacı bilgilerinin elde edilmesine fayda sağlayacaktır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Ceviz yetiştiriciliği yapan ve gen kaynağına sahip olan her ülkenin yapması gerektiği gibi ülkemizin de kendi ceviz gen kaynaklarını DNA düzeyinde tanımlaması gerekmektedir. Bu durum ülkemizdeki ceviz yetiştiriciliği ve ıslahı için oldukça önemlidir. Böylece ülkemiz gen kaynaklarında bulunan ceviz çeşit ve genotiplerinin DNA parmak izlerinin çıkartılmasıyla ülkemizde büyük sorun haline gelen ismine doğru ceviz fidanı üretimi ve dağıtımı kontrol edilebilir hale gelebilecek ve ileride yapılacak ıslah çalışmalarına da genetik bilgi sağlanmış olacaktır. Moleküler araçlar ve DNA belirteçlerindeki yeni gelişmeler ceviz genotiplerinin biyoçeşitliliğinin belirlenmesinde doğrudan etkili olabilecektir. Ülkemizde çeşitli moleküler markır yöntemleri yapılan çalışmalarda kullanılmıştır [44]. Ceviz genotiplerinin yayılım alanlarının belirlenmesinde, gen kaynaklarının karşılaştırılmasında, ceviz genotiplerinin karakterizasyonunda ve ceviz ıslah programlarında en iyi ebeveynlerin seçilmelerine yardımcı olmak amacı ile bu şimdiye kadar yapılan çalışmalardan çıkan sonuçlar kullanılabilir. Ülkemizde ceviz yetiştiriciliğinin en önemli sorunu ismine doğru aşılı ceviz fidanları ile kapama bahçelerinin kurulamamasıdır. Bu nedenle, bu çalışma sonucunda elde edilen ceviz genotiplerine özgü DNA parmak izleri ceviz fidanlarının ismine doğru olup olmadığının belirlenmesinde kullanılabilir. Bunların ötesinde, cevizde gençlik kısırlığı dönemi uzun olduğu için cevizde moleküler ıslaha geçişin bir an önce sağlanması gerekir. Bu da bundan sonra cevizde ekonomik öneme sahip bazı bitki özellikleri ile ilişkili DNA markörlerinin geliştirilmesine bağlıdır. Bu nedenle, bundan sonra yapılacak çalışmalara genetik haritalama ve QTL (quantitative trait loci) analizlerinin eklenmesi de önemlidir.

KAYNAKLAR

1. Şen, S. M., 1986. Ceviz Yetiştiriciliği. *Eser Matbaası. Samsun*, s.229.
2. Manning, W. E., 1978. The Classification With in the *Juglandaceae*. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 65:1058–1087.
3. Stanford, A. M., Harden, R., Parks, C. R., 2000. Phylogeny and Biogeography of

- Juglans* (Juglandaceae) Based on Matk and ITS Sequence Data. *Am. J. Botany* 8:872–882.
4. Doğan, Y., Kafkas, S., Sütyemez, M., Akça, Y., Türemiş, N., 2014. Assessment and Characterization of Genetic Relationships of Walnut (*Juglans regia* L.) Genotypes by Three Types of Molecular Markers. *Scientia Horticulturae* 168:81–87.
 5. Anonim, 2014. Türkiye İstatistik Kurumu (TUIK). (<https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>) (Erişim Tarihi: 15.01.2016).
 6. Mackenzie, S. J., Mertely, J. C., Peres, N. A., 2009. Curative and Protectant Activity of Fungicides for Control of Crown Rot of Strawberry Caused by *Colletotrichum Gloeosporioides*. *Plant Dis.* 93(8):815–20.
 7. Seehalak, W., Moonsom, S., Metheenukul, P., Tantasawat, P., 2011. Isolation of Resistance Gene Analogs from Grapevine Resistant and Susceptible To Downy Mildew and Anthracnose. *Sci Hortic.* 128:357–63.
 8. An, H. S., Yang, K. Q., 2014. Resistance Gene Analogs in Walnut (*Juglans regia*) Conferring Resistance to *Colletotrichum Gloeosporioides*. *Euphytica* 197(2):175–90.
 9. Fornari, B., Malvolti, M. E., Turchini, D., 2001. Isozyme and Organellar DNA Analysis of Genetic Diversity in Natural/Naturalised European and Asiatic Walnut (*Juglans regia* L.) Populations. *Acta Hort. Sci.* 544:167–178.
 10. Vyas, D., Sharma, S.K., Sharma, D. R., 2003. Genetic Structure of Walnut Genotype Using Leaf Isozymes as Variability Measure. *Sci. Hortic.* 97:141–152.
 11. Fjellstrom, R. G., Paritt, D. E., McGranahan, G. H., 1994. Genetic Relationships and Characterization of Persian Walnut (*Juglans regia* L.) Cultivars Using Restriction Fragment Length Polymorphisms (Rflps). *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 119:833–839.
 12. Malvolti, M. E., M. Paciucci, F. Cannata, S. Fineschi, 1993. Genetic Variation in Italian Populations of *J. regia* L. *Acta Hort.* 311:86–94.
 13. Malvolti, M. E., Fornari, B., Maccaglia, E., Cannata, F., 2001. Genetic Linkage Mapping in a Intraspecific Cross of Walnut (*Juglans regia* L.) Using Molecular Markers. *Acta Hort.* 544:179–185.
 14. Woeste, K., Burns, R., Rhodes, O., Michler, C., 2002. Thirty Polymorphic Nuclear Microsatellite Loci from Black Walnut. *J. Heredity* 93:58–60.
 15. Dengl, S. G., Woeste, K., Aradhya, K. M., Koehmstedt, A., Simon, C., Potter, D., Leslie, A. C., Mcgranahan, G., 2005. Characterization of 14 Microsatellite Markers for Genetic Analysis and Cultivar Identification of Walnut. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 130:348–354.
 16. Foroni, I., Rao, R., Woeste, K., 2006. Molecular Characterization of *Juglans regia* L. Cultivar with SSR Markers. *Acta Hort.* 705:207–213.
 17. Foroni, I., Woeste, K., Monti, L. M., Rao, R., 2007. Identification of ‘Sorrento’ Walnut Using Simple Sequence Repeats (SSRS). *Genet Resour Crop Evol* 54:1081–1094.
 18. Arulsekhar, S., Mcgranahan, G. H., Parfitt, D. E., 1986. Inheritance of Phosphoglucumutase and Esterase Isozymes in Persian Walnut. *J. Hered* 77:220–221.
 19. Solar, A., J. Smole, F. Stampar, M. Virscek Marn, 1994. Characterization of Isozyme Variation in Walnut (*Juglans regia* L.). *Euphytica* 77:105–112.
 20. Fornari, B., Cannata, F., Spada, M., Malvolti, M. E., 1999. Allozyme Analysis of Genetic Diversity and Differentiation in European and Asiatic Walnut (*Juglans regia* L.) Populations. *Forest Genet* 6:115–127.
 21. Nicese, F. P., Hormaza, J. I., Mcgranahan, G. H., 1998. Molecular Characterization and Genetic Relatedness among Walnut (*Juglans regia* L.) Genotypes Based on RAPD Markers. *Euphytica*, 101:199–206.
 22. Fatahi, R., A. Ebrahimi, Z. Zamani, 2010. Horticulture Environment and Biotechnology. 51(1):51–60.
 23. Ertürk, U., Dalkılıç, Z., 2011. Determination of Genetic Relation Ship among Some Walnut (*Juglans regia* L.) Genotypes and Their Early–Earing Progenies Using RAPD Markers. *Romanian Biotechnological Letters* 16(1):5944–5952.
 24. Potter, D., Fangyou, G., Aiello, G., Leslie, G., McGranahan, G. H., 2002. Intersimple Sequences Repeat Markers For fingerprinting and Determining Genetic Relationships of Walnut (*Juglans regia*) Cultivars. *J. Hort. Sci. Biotech* 127:75–81.

25. Christopoulos, M. V., Rouskas, D., Tsantili, E., Bebeli, P. J., 2010. Germplasm Diversity and Genetic Relationships among Walnut (*Juglans regia* L.) Cultivars and Greek Local Selections Revealed by Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. *Sci. Hortic.* 125:584–592.
26. Bayazit, S., Kazan, K., Gulbitt, S., Cevik, V., Ayanoglu, H., Ergul, A., 2007. AFLP Analysis of Genetic Diversity in Low Chill Requiring Walnut (*Juglans regia* L.) Genotypes from Hatay, Turkey. *Sci. Hortic.* 111:394–398.
27. Ma, Q. G., J. P. Zhang, D. Pei, 2011. Genetic Analysis of Walnut Cultivars in China Using Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 136: 422–428.
28. Ciarmiello, L. F., P. Piccirillo, G. Pontecorvo, A. De Luca, P. Woodrow, 2011. A PCR Based SNP Marker for Specific Characterization of English Walnut (*Juglans regia* L.) Cultivars. *Mol. Biol. Rep.* 38(2):1237–1249.
29. Wang, H., Pei, D., Gu, R. S., Wang, B. Q., 2008. Genetic Diversity and Structure of Walnut Populations in Central and Southwestern China Revealed by Microsatellite Markers. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 133:197–203.
30. Hoban, S., Anderson, R., McCleary, T., Schlarbaum, S., Romero-Severson, J., 2008. Thirteen Nuclear Microsatellite Loci for Butternut (*Juglans cinerea* L.). *Mol. Ecol. Resour.* 8:643–646.
31. Pollegioni, P., Woeste, K., Mugnozza, G. S., Malvolti, M. E., 2009. Retrospective Identification of Hybridogenic Walnut Plants By SSR Fingerprinting and Parentage Analysis. *Mol. Breed.* 24:321–335.
32. Karimi, R., Ershadi, A., Vahdati, K., Woeste, K., 2010. Molecular Characterization of Persian Walnut Populations in Iran with Microsatellite Markers. *Hortscience* 45:1403–1406.
33. Zhang, R., Zhu, A., Wang, X., Yu, J., Zhang, H., Gao, J., Cheng, Y., Deng, X., 2010. Development of *Juglans regia* SSR Marker by Data Mining of the EST Database. *Plant Mol. Biol. Rep.* 28, 646–653.
34. Zhang, Z. Y., Han, J. W., Jin, Q., Wang, Y., Pang, X. M., Li, Y. Y., 2013. Development and Characterization of New Microsatellites for Walnut (*Juglans regia*). *Genet. Mol. Res.* 12:4723–4734.
35. Yi, F., Zhi-Jun, Z., She-Long, Z., Shu-Ping, L., 2011. Development of Walnut EST SSR Markers and Primer Design. *Agric. Sci. Technol.* 12:1810–1813.
36. Ebrahimi, A., Fatahi, R., Zamani, Z., 2011. Analysis of Genetic Diversity among Some Persian Walnut Genotypes (*Juglans regia* L.) Using Morphological Traits and SSR Markers. *Sci. Hortic.* 130:146–151.
37. Pollegioni, P., Woeste, K., Olimpieri, I., Marandola, D., Cannata, F., Malvolti, M. E., 2011. Long-Term Human Impacts on Genetic Structure of Italian Walnut Inferred by SSR Markers. *Tree Genetics Genomes* 7:707–723.
38. Pollegioni, P., Olimpieri, I., Woeste, K. E., Simoni, G., Gras, M., Malvolti, M. E., 2012. Barriers to Interspecific Hybridization between *Juglans nigra* L. and *J. regia* L. Species. *Tree Genetics Genomes* 9:291–305.
39. Chen, C. M., Han, S. J., Yuan, S. S., Wang, C. J., Yu, J. H., 2013. Isolation and Characterization of 20 Polymorphic Microsatellite Markers for *Juglans mandshurica* (Juglandaceae). *Bioone* 1:1–4.
40. Chen, L., Ma, Q., Chen, Y., Wang, B., Pei, D., 2014. Identification of Major Walnut Cultivars Grown in China Based on Nut Phenotypes and SSR Markers. *Sci. Hort.* 168:240–248.
41. Najafi, F., Mardi, M., Fakheri, B., Pirseyedi, S. M., Mehdinejad, N., Farsi, M., 2014. Isolation and Characterization of Novel Microsatellite Markers in Walnut (*Juglans regia* L.). *Am. J. Plant Sci.* 5:409–415.
42. Topçu, H., Ikhsan, A. S., Sütyemez, M., Çoban, N., Güney, M., Kafkas, S., 2015. Development of 185 Polymorphic Simple Sequence Repeat (SSR) Markers from Walnut (*Juglans regia* L.). *Sci. Hort.* 194:160–167.
43. Kafkas, S., Özkan, H., Sütyemez, M., 2005. DNA Polymorphism and Assessment of Genetic Relationships in Walnut Genotypes Based on AFLP and SAMPL Markers. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 130:585–590.
44. Bayazit, S., Kazan, K., Gulibini, S., Çevik, V., Ayanoglu, H., Ergul, A., 2006. AFLP Analysis of Genetic Diversity in Low Chill Requiring Walnut (*J. regia* L.) Genotypes from Hatay, Türkiye. *Sci. Hort.* 111:394–398.