

Ticari Hibrit Domates (*Solanum Lycopersicum L.*) Çeşitlerinde Genetik Safiyyetin Moleküler Markırlarla Belirlenmesi

Nuray İşidoğru, Gülhan Baytekin, İskender Tiryaki

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü

e-posta: itiryaki@comu.edu.tr

Özet

Bu çalışma, piyasada ticari olarak satışa sunulan hibrit (F₁) domates çeşitlerinde genetik safiyyetin moleküler markırlar kullanılarak belirlenmesi amacıyla Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Bitki Moleküler Genetiği ve Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. İki farklı tohumluk firmasına ait F₁ domates çeşidinin materyal olarak kullanıldığı çalışmada 3 adet SRAP ve 1 adet URP olmak üzere toplam 4 adet DNA markırı test edilmiştir. Her iki domates çeşidinde, yetiştirilen fidelerden tesadüfen seçilen 7-8 farklı bitkiye ait genomik DNA'lar ekstrakt edilmiş ve devamında, ekstraktlara ait DNA konsantrasyonları çeşitlenerek PCR analizinde kullanılmıştır. PCR şartlarının domates bitkisine göre optimize edildiği çalışmada DNA markırlarına ait ileri (F) ve geri (R) primerler kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri %1'lik agarose jelde elektroforez işlemi ile moleküler büyüklüklerine göre ayrıştırılmış ve Ethidium Bromide ile boyanarak UV ışık altına görüntülenmiştir. Analiz sonuçları, Me2F/Em2R ve Me2F/Em10R kodlu SRAP markırlarının çeşit içi ve çeşitler arasında aynı DNA bölgelerine bağlanarak amplifikasyon yaptıklarını ve çeşitler arası aynı büyüklükte monomorfik bant ürettiklerini göstermiştir. Diğer taraftan, Me10F/Em10R kodlu SRAP markırı ile URP32F/URP4R kodlu URP markırlarının hem çeşitler arasında hem de aynı çeşidin farklı bireyleri arasında farklı DNA bölgelerine bağlanarak farklı amplifikasyonlara neden olduğu ve polimorfik bant ürettikleri tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, piyasada ticari olarak satışa sunulan hibrit domates tohumluklarında genetik safiyet sorunlarının var olduğuna işaret etmektedir.

Anahtar kelimeler: Domates, F₁, DNA, markır

Determination of Genetic Purity of Commercial Hybrid Tomato Varieties Using Molecular Markers

Abstract

This study was conducted to determine genetic purity of commercial hybrid tomato varieties by using molecular markers at Çanakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Agriculture, Department of Agricultural Biotechnology, Plant Molecular Genetics and Biotechnology laboratory. A total of four (three SRAP and one URP) DNA markers were tested in two different tomato varieties provided from two different private seed companies. Genomic DNAs were extracted from randomly chosen 7-8 seedlings of each variety. DNA concentrations of extracts were equalized and were used in PCR analysis. PCR conditions of forward (F) and reverse (R) primers for each DNA marker was specifically optimized for tomato and was used in PCR analysis. PCR products separated in 1% agarose gel electrophoresis were stained with Ethidium Bromide and were visualized under UV light. Results revealed that DNA markers encoded with Me2F/Em2R and Me2F/Em10R were annealed and amplified the same DNA regions, and produced the same size of monomorphic bands for both varieties. On the other hand, markers encoded with Me10F/Em10R (SRAP) and URP32F/URP4R (URP) produced polymorphic bands as a result of amplifications of primers in different DNA regions within and between two varieties. The results suggested that there are some genetic purity problems for commercial hybrid seeds of tomato varieties.

Keywords: Tomato, F₁, DNA, marker

Giriş

Domates, dünyada genelinde tarla ve sera şartlarında üretimi yapılan en önemli kültür bitkilerinden biridir. Doğrudan sevilerek tüketimi yanında gıda sanayinde konserve, salça, turşu ve ketçap gibi birçok alanda kullanılması, bitkinin ekonomik önemini artırmakta ve dünya genelinde ticaretinin yoğun bir şekilde yapılmasına neden olmaktadır (Keskin, 2012; Robertson ve Labate, 2007). Bitki aynı zamanda fizyolojik ve moleküler çalışmalar için de model

bitki olarak kullanılmaktadır (Mueller ve ark., 2009; Mueller ve ark., 2005). Dünya genelinde birçok ülkede yetiştirilebilen domates iklim ve toprak şartlarının uygun olduğu ülkemizde de çok önemli bir üretim potansiyeline sahiptir (Keskin, 2012; Keskin ve ark., 2008). Türkiye, dünya domates üretiminde Çin, Hindistan ve Amerika'dan sonra ilk sıralarda yer almaktadır (Keskin, 2012).

Küçük alanlarda, yüksek girdiler kullanılarak yoğun bir emekle yapılan sebze

tarımında kaliteli tohumluk kullanımını en önemli girdilerden birini oluşturmaktadır (Balkaya, 2012; Korkmaz ve Tiryaki, 2005). Kaliteli tohumluk kullanımı özellikle yoğun tarım uygulamalarının yapıldığı sebzeçilikte verim ve kalitenin ön şartını oluşturmaktadır (Balkaya, 2009). Günümüzde sebze yetiştiriciliğinde hibrit çeşit kullanımı giderek artmaktadır. Hibrit çeşitlerin ıslahçı ve tohum üreticileri açısından sağladığı birçok avantajlar yanında yüksek adaptasyon yeteneği, dayanıklılık, verim ve kalite gibi özellikleri nedeniyle de üreticiler tarafından kullanımı her geçen gün artmaktadır (Yanmaz, 2006).

Bu çalışmanın amacı, piyasada yüksek fiyatlarla satılan hibrit domates tohumluklarındaki genetik saflığı moleküler markırlar yardımı ile ortaya koymaktır.

Materyal ve Yöntem

Çalışmada materyal olarak Bursa ve Antalya kökenli iki farklı ticari firmadan temin edilen F₁ domates tohumları oluşturmaktadır.

DNA İzolasyonu

Çeşitlere ait tohumlar içerisinde torf bulunan bardaklara ekim derinliği 2-3 cm olacak şekilde ekilmiş ve çıkan fideler 3-5 yapraklı olacak seviyeye geldiğinde fidelerden genç yaprak dokuları makasla kesilerek eppendorf tüplerine konulmuş ve -80°C'lik buzdolabında DNA ekstraksiyon işlemi yapılıncaya kadar muhafaza edilmiştir. Sıvı azot kullanılarak eppendorf tüpler içerisinde homojenize edilen yaprak örneklerinden DNA ekstraksiyonu DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak (Favorgen, Pingtung, Taiwan), firmanın belirttiği protokole göre gerçekleştirilmiştir.

DNA Konsantrasyon Eşitlemesi

Ekstraktlara ait DNA konsantrasyonları %1'lik agarose jelde kıyaslama yöntemine göre konsantrasyonları belirlenmiş ve tüm örneklerle ait DNA konsantrasyonları 20ng/ul olacak şekilde eşitlenmiş. Konsantrasyonu eşitlenen DNA'lar PCR analizinde kullanılmıştır.

DNA Markırları

Çalışmada literatürde belirtilen URP ve SRAP markırları kullanılmıştır (Kang ve ark., 2002; Li ve Quiros, 2001). DNA markırlarına ait ileri (F) ve geri (R) primer dizileri, erime sıcaklıkları (T_m) ve domatese göre optimize edilen bağlanma sıcaklıkları (T_a) Çizelge 1.'de verilmiştir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Koşulları

PCR reaksiyonları, 8'li PCR tüplerinde, 20 µl'lik toplam reaksiyon hacminde Applied Biosystems marka Veriti 96 Well Thermal Cycler (PCR makinesi) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, son konsantrasyonları; 1x PCR tamponu (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, %0.01 jelatin), 100ng genomik DNA, 0.5 mM dNTPs, 25 mM MgCl₂, 50ng primer (F+R), 0.5 U Taq DNA polimeraz (Promega) enzimi olacak şekilde bileşenler mikrotüplerde bir araya getirilmiştir. PCR reaksiyonu, primerlerin bağlanma bölgelerinin kopya sayısını artırmak amacıyla birbirini takip eden ön ve asıl döngü olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Ön döngüde; tüpler 94°C'de 4 dakika, primerlerin bağlanması için 35°C'de 30 saniye, 72°C'de 50 saniye olan reaksiyon döngüsünden toplam 5 döngü kullanılmıştır. Asıl döngü 95°C'de 45 saniye, primer spesifik bağlanma sıcaklıklarında 55 saniye, 72°C'de 1:10 dakika olan reaksiyon döngülerinden geçirilerek ve son olarak 72°C'de 3 dakika tutularak toplam 35 döngü olacak şekilde reaksiyon tamamlanmıştır.

PCR işlemi sonucu elde edilen PCR ürünleri jele yüklenerek 90 volt ve 35-40 amper sabit akımda %1'lik agaroz jelde 1 saat süreyle yürütülmüştür. Devamında jeller 0.002 ng/ml Ethidium Bromide (EtBr) içeren 0.5X Tris-borate buffer ile muamele edilmiş ve UV transillüminatör kullanılarak görüntülenmiştir. Görüntülenen jellerin fotoğrafları çekilerek kayıt altına alınmıştır.

Araştırma Bulguları

Me2F/Em2R ve Me2F/Em10R kodlu SRAP markırlarının her iki domates çeşidinde de aynı moleküler büyüklükte monomorfik bant ürettikleri, söz konusu markırların çeşitler arası ve çeşit içinde tek bitki bazında aynı DNA bölgelerine bağlanarak amplifikasyon oluşturduğu görülmüştür. Diğer taraftan, Me10F/Em10R kodlu SRAP markırı ile URP32F/URP4R kodlu URP markırı hem çeşitler arasında hem de aynı çeşidin farklı bireyleri arasında farklı DNA bölgelerine bağlanarak polimorfik bant ürettikleri tespit edilmiştir (Şekil 1).

Sonuç

Ülkemizde domates üretimi büyük ölçüde hibrit tohumluk üzerinden elde edilen fide

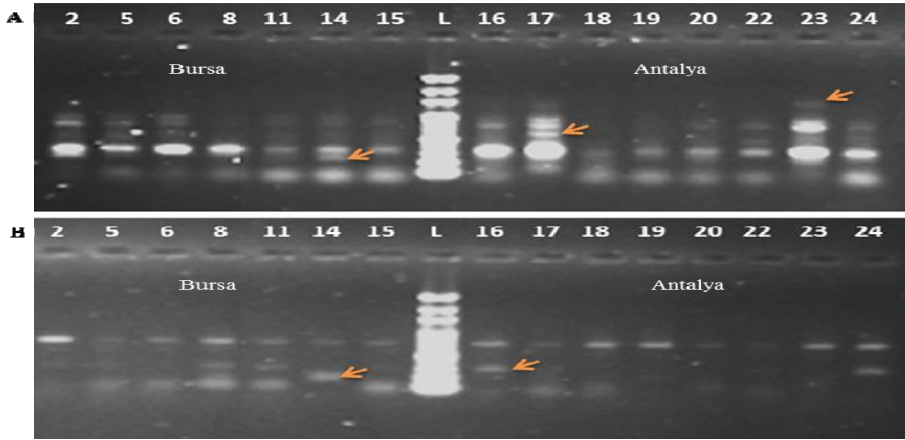
yetiştiriciliği şeklinde yapılmaktadır. Sebze üreticilerinin en önemli girdilerinden birini oluşturan hibrit tohumlar, üreticilerin verdikleri paranın karşılığını almaları yanında bu tohumların kullanılması sonucu elde edilecek ürünün verim ve kalite beklentilerinin karşılanması bakımından da oldukça önemlidir. Bu beklentilerin karşılanması satın alınan tohumlardaki genetik safiyete doğrudan bağlı olduğu gibi ticari anlamda şeffaflığın da bir gereğidir. Bu çalışma piyasada satışa sunulan F₁ domates tohumlarında genetik safiyet sorunlarının var olduğunu göstermesi bakımından oldukça önemlidir. Söz konusu sorun, hibrit domates olarak satışı yapılan tohumlarda paket içerisinde fiziksel karışımların var olabileceğini ya da F₁ eldesinde kullanılan ebeveyn hatların yeterli genetik safiyete sahip olmadan melez tohumluk üretiminde kullanıldıklarına işaret etmektedir.

Kaynaklar

- Balkaya, A., 2009. Türk Tarımında Tohumculuğun Stratejik Önemi. Türk Tarım Dergisi 188:39-45.
- Balkaya, A., 2012. Türkiye sebze tohumculuk sektörünün güçlü ve zayıf yönleri ile gelecekte yapılması gerekenler. Türktob Türkiye Tohumcular Birliği Dergisi 6-9.
- Kang, H.W., Park, D.S., Go, S.J., Eun, M.Y., 2002. Fingerprinting of diverse genomes using PCR with universal rice primers generated from repetitive sequence of Korean weedy rice. Mol Cells 13: 281-287.
- Keskin, G., 2012. Domates ve domates salçası durum ve tahmin 2011/2012. Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü Yayın No : 201 Kasım, Ankara.
- Keskin, G., Nazlı, C., Özudoğru, T., 2008. Türkiye Yaş Meyve Sebze'de AB ile Rekabet Edebilir mi? Domates Alt Sektör Analizi. Türkiye VIII. Ulusal Tarım Ekonomisi Kongresi Bildirileri, Gıda Pazarlaması, 1-12, 25-27 Haziran 2008, Bursa.
- Korkmaz, A., Tiryaki, İ., 2005. Düşük sıcaklıkların tohum çimlenmesi üzerine etkileri. Alatarım 4: 32-40.
- Li, G., Quiros, C.F., 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. Theoretical and Applied Genetics 103:455-461.
- Mueller, L.A., Lankhorst, R.K., Tanksley, S.D., Giovannoni, J.J., White, R., Vrebalov, J., Fei, Z.J., van Eck, J., Buels, R., Mills, A.A., Menda, N., Tecle, I.Y., Bombarely, A., Stack, S., Royer, S.M., Chang, S.B., Shearer, L.A., Kim, B.D., Jo, S.H., Hur, C.G., Choi, D., Li, C.B., Zhao, J.H., Jiang, H.L., Geng, Y., Dai, Y.Y., Fan, H.J., Chen, J.F., Lu, F., Shi, J.F., Sun, S.H., Chen, J.J., Yang, X.H., Lu, C., Chen, M.S., Cheng, Z.K., Li, C.Y., Ling, H. Q., Xue, Y.B., Wang, Y., Seymour, G.B., Bishop, G.J., Bryan, G., Rogers, J., Sims, S., Butcher, S., Buchan, D., Abbott, J., Beasley, H., Nicholson, C., Riddle, C., Humphray, S., McLaren, K., Mathur, S., Vyas, S., Solanke, A.U., Kumar, R., Gupta, V., Sharma, A.K., Khurana, P., Khurana, J.P., Tyagi, A., Sarita, Chowdhury, P., Shridhar, S., Chattopadhyay, D., Pandit, A., Singh, P., Kumar, A., Dixit, R., Singh, A., Praveen, S., Dalal, V., Yadav, M., Ghazi, I.A., Gaikwad, K., Sharma, T.R., Mohapatra, T., Singh, N.K., Szinay, D., de Jong, H., Peters, S., van Staveren, M., Datema, E., Fiers, M.W.E.J., van Ham, R.C. H.J., Lindhout, P., Philippot, M., Frasse, P., Regad, F., Zouine, M., Bouzayen, M., Asamizu, E., Sato, S., Fukuoka, H., Tabata, S., Shibata, D., Botella, M.A., Perez-Alonso, M., Fernandez-Pedrosa, V., 2009. A Snapshot of the Emerging Tomato Genome Sequence. Plant Genome 2:78-92.
- Mueller, L.A., Tanksley, S.D., Giovannoni, J.J., van Eck, J., Stack, S., Choi, D., Kim, B.D., Chen, M.S., Cheng, Z.K., Li, C.Y., Ling, H.Q., Xue, Y.B., Seymour, G., Bishop, G., Bryan, G., Sharma, R., Khurana, J., Tyagi, A., Chattopadhyay, D., Singh, N.K., Stickema, W., Lindhout, P., Jesse, T., Lankhorst, R. K., Bouzayen, M., Shibata, D., Tabata, S., Granell, A., Botella, M.A., Giullano, G., Frusciante, L., Causse, M., Zamir, D., 2005. The Tomato Sequencing Project, the first cornerstone of the International Solanaceae Project (SOL). Comparative and Functional Genomics 6: 153-158.
- Robertson, L.D., Labate, J.A., 2007. Genetic resources of tomato (*Lycopersicon esculentum* var. *esculentum*) and wild relatives. In: Mattoo, M.R.A. (Eds), Genetic improvement of Solanaceous crops vol I: Tomato. pp. 25-75. Science Publishers Inc, Enfi eld, NH.
- Yanmaz, R., 2006. Sebze yetiştiriciliğinde hibrit çeşit kullanımı ve çeşit önerileri. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi 15:11-18.

Çizelge 1. Araştırmada kullanılan markırların adı, baz dizilimi, GC oranı (%), erime sıcaklıkları (°C), bağlanma sıcaklıkları (°C).

Primer Adı	Baz Dizilimleri (5'-3')	GC Oranı (%)	Erime (T _m) Sıcaklıkları (°C)	Bağlanma (T _a) Sıcaklıkları (°C)
URP32F	TACACGTCTCGATCTACAGG	%50	65.0°C	50°C
URP4R	AGGACTCGATAACAGGCTCC	%55	66.0°C	
Me2F	TGAGTCCAAACCGGAGC	%59	49.5°C	50°C
Em2R	GACTGCGTACGAATTTGC	%50	48.0 °C	
Me2F	TGAGTCCAAACCGGAGC	%59	49.5°C	50°C
Em10R	GACTGCGTACGAATTCAT	%44	45.8°C	
Me10F	GACTGCGTACGAATTCAT	%44	45.8°C	50°C
Em10R	TGAGTCCAAACCGGAAA	%44	44.6°C	



Şekil 1. URP32F/URP4R ve Me10F/Em10R primerlerinin oluşturduğu polimorfik bant görüntüleri. Bant üzerindeki rakamlar her bir çeşitten tesadüfen seçilen bitkileri; L, 50 bp DNA markır. L'nin sol tarafı Bursa, sağ tarafı ise Antalya kaynaklı F₁ domates bitkilerini göstermektedir. (A) URP32F/URP4R; (B) Me10F/Em10R primerlere ait elektroforez jel görüntüleri. Polimorfik bant örnekleri oklarla işaret edilmiştir.