

artan çeşit geliştirme çalışmaları ve tohumculuk politikaları ülkemize birçok çeşidin girmesine olanak tanımış fakat bu durum üretim miktarlarına olumlu katkılarının yanında yerel genotiplerin kullanımından vazgeçilmesi gibi birçok olumsuzluğu da beraberinde getirmiştir. Çünkü yerel genotipler gelecekteki ıslah çalışmalarında kullanılacak olan ve bazı konulardaki potansiyelleri henüz tam anlamıyla bilinmeyen oldukça önemli kaynaklardır (Sözen, 2006).

Türkiye, birçok bitki türü için gen merkezi konumunda olmadığı halde, hem özel hem coğrafi konumu itibarıyla çok yüksek düzeyde genetik varyasyon barındırmaktadır. Hatta bazı durumlarda, bu varyabilitenin kültüre alınmış genotiplerde, yabancı popülasyonlara göre çok daha yüksek olabileceği bildirilmiştir (Tan, 1998; Tan ve Açıkgoz, 2002).

Bitki genetik kaynakları köy popülasyonları, bunların yabancı akrabaları, kullanılmayan eski çeşitler ve genetik özellikleri tam olarak belirlenmiş hatlardan oluşmaktadır. Bu genetik kaynaklar ise genetik çeşitliliğin oldukça önemli olup, bir bitki türünün gen havuzundaki kalıtsal bilginin zenginliğini içermektedir (Akbulut ve ark., 2014).

Değişik bölgelerden toplanan 125 adet fasulye genotipinde yapılan bir çalışmada ise fasulye genotiplerinin bitkisel özellikleri değerlendirilerek genotipler arasındaki çeşitlilik saptanmaya çalışılmıştır. Çalışmada incelenen özellikler geniş bir varyasyon göstermiş özellikle yüz dane ağırlığına göre genotipler çarpıcı şekilde Güney Amerika ve Orta Amerika orijinli olarak tespit edilmiştir (Türkmen ve ark., 2013).

Günümüzde dünyada olduğu gibi ülkemizde de moleküler tekniklerin gelişmesine paralel olarak bitki ıslahında da moleküler anlamda önemli gelişmeler kaydedilmektedir. Genotipik farklılıkların tespit edilmesinde ve bu farklılıkların değerlendirilip bazı tarımsal özelliklerin seçiminde RAPD ve ISSR gibi standart moleküler genetik laboratuvarlarında rahatlıkla uygulanabilen moleküler markör tekniklerin kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır (Hakkı ve ark., 2007).

Fasulye için ISSR primeri kullanılarak yapılan bir çalışmada 27 primerden 169 DNA bandının 129'u polimorfik bant olarak elde

edilmiş ve yapılan kümeleme analizi sonucunda SK-222 ile SK-131 genotipleri arasında Jaccard katsayısına göre %70 benzerlik tespit edilmiştir (Işık, 2012).

Portekiz'de 88 adet yetiştirme alanından toplanılmış ticari fasulye çeşitleri arasında taze fasulye koleksiyonu üzerinde 17 kantitatif, kalitatif ve biyomoleküler özellikler üzerine incelemeler yapılmış ve sonuçta, Portekiz'e ait olan taze fasulyelerde orijin, yetiştirme ve genetik ayırtılma belirlenmiştir (Rodino ve ark., 2001).

Galicia'daki yerel fasulye çeşitleri arasındaki genetik farklılığın tespiti amacıyla yapılan bir çalışmada 66 adet yerel çeşitte protein band desenlerinin dağılımları tespit edilmiş ve araştırma sonucunda yerel çeşitler, 14 kantitatif ve 5 kalitatif özellik yönünden cluster analizi yöntemine göre, 11 grup oluşturmuşlardır (Escribano ve ark., 1998).

10 adet ISSR primeri kullanılarak yapılan bir çalışmada elde edilen 92 bandın 82 tanesi polimorfik olarak bulunmuş ve üç farklı coğrafyadan toplanan materyaller arasında Jaccard katsayısı kullanılarak dört ana grup elde edilmiş ve genotipler arasında ortak kan taşıyan bireyler belirlenmiştir. Bu genetik çeşitlilik ise fasulye genotiplerinin doğal olarak kendilenmesi ile ilişkilendirilmiştir (Ortega, 2014).

Bu çalışmada teksele seleksiyonla ıslah edilmiş 34 çeşit aday ve 3 ticari, çeşit (Bulduk, İspir ve Sarıkız) ISSR tekniği kullanılarak genetik akrabalık ilişkileri ortaya konulmuştur.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Araştırma Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü iklim odası, sera ve laboratuvarlarında yapılmıştır. Çalışmada bitki materyali olarak Ülkemizin çeşitli yörelerinden toplanıp seleksiyona tabi tutulan ve agronomik özellikleri bilinen edilmiş 34 fasulye çeşit aday ve Sarıkız, Bulduk ve İspir çeşitleri kullanılmıştır.

Yöntem

Deneme 2015 yılı erken ilkbahar döneminde hatlara ait tohumların Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri seralarında tohum ekimi ile başlamıştır. Moleküler çalışmalar için bitkiler fide döneminde iken genç yapraklardan her

genotipden ayrı olarak 12'ser yaprak örneği alınmış; toplamda 444 bitkinin izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon işlemi Doyle ve Doyle (1987)'in geliştirdiği CTAB metodundan yararlanarak bir yöntemle yapılmıştır.

DNA'ların CTAB metodu ile izolasyonun ardından elde edilen genomik DNA'nın 230, 260 ve 280 nm dalga boylarında yapılan okumalarla kalite ve kantite analizleri yapılmıştır. Elde edilen stok DNA solüsyonundan 40ng/µl olacak şekilde çalışma konsantrasyonlarına seyreltilmiştir. Her genotip için ayrı ayrı izolasyonu yapılan 12 örnek 6'sarlı olarak iki gruba ayrılmış ve toplam 37 genotip için iki adet Bulk Set (her birinin içerisinde 6 adet genotipe ait DNA karışımı) oluşturulmuştur. Böylece genotiplerin birbirleriyle olan akrabalıkları popülasyonu bütün olarak inceleme olanağı sağlanmıştır.

PCR çalışmaları ise 40ng/µl olan çalışma konsantrasyonlarında, oluşturulan Bulk Setler üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Genotipler arasındaki genetik ilişkiler, akrabalık dereceleri dominant karakterli bir markör sistemi olan ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) tekniğinden yararlanarak belirlenmiştir. Çalışmada; 27 adet ISSR primeri denenmiş olup bunlar arasından akrabalık ilişkilerini belirlemede bilgi verici nitelikte olan 21 adedi ile tamamlanmıştır.

ISSR tekniği son zamanlarda bitkisel araştırmalarda sıklıkla kullanılan tekrarlanabilirliği yüksek bir moleküler karakterizasyon aracıdır. Yöntemin uygulanması için az miktarda DNA örneğinin bulunması yeterlidir.

Di-, tri-nükleotid tekrarlarının sıklıkla yer aldığı ökaryotik genomlarda yaygın olarak kullanılan ve bu basit tekrar dizilerinin analizine dayanan bir yöntemdir. Genomlara özgü olabilen bu tekrar dizileri kodominant karakterizasyona olanak sağlamakla birlikte, bu tekrar dizilerinin kendileri ve uzantıları primer olarak kullanıldığında ise spesifik olmayan dominant özellikli markörler haline dönüşürler. Çalışmamızda bu tip markörler kullanılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Yapmış olduğumuz çalışmada teksel seleksiyon yoluyla elde edilen genotiplerden DNA izolasyonları gerçekleştirilerek, 21 adet

ISSR primeri ile PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

PCR işleminin ardından skorlanan bantlar Bulk 1 ve Bulk 2 için ayrı ayrı değerlendirilip her çeşit adayı için benzerlik ya da farklılıkları belirlemek amacıyla, aynı satırdaki bantlara bakılarak elde edilen sonuçlar 1 var, 0 yok, çalışmayan örnek için ise 9 şeklinde skorlanmıştır (Şekil 1).

Skorlama sonucunda ise Bulk 1 için 104 adet, Bulk 2 için 108 adet polimorfik bant elde edilmiştir (Çizelge 1).

Sonuç

Oluşturulan Bulk Setler için NTSYS pc2.1 paket programı kullanılarak Simple Matching benzerlik indeksine göre genotiplerin aralarındaki ilişkiler ortaya konmuştur (Şekil 2).

Buna göre kullanılan standart çeşitler ile çalışmadaki çeşit adaylarının iki farklı grupta yer aldıkları görülmüştür. Her iki Bulk grubunda da analiz sonuçlarının benzerlik gösterdiği saptanmış ve bu veriler Mantel Testi ile analiz edilmiştir. Ayrıca Temel Koordinatlar Analizinde yapılmış olup dendrogram ile sonuçların benzerlik gösterdiği görülmüştür.

Aynı matriksten elde edilen sonuçların kullanılması ile yapılan temel koordinatlar analizinde ise dendrogramdaki sonuçlar paralelinde genetik ilişkiler vektörel gösterimle ele alınmıştır. NTSYS pc2.1 paket programında Mantel grafiği çizilmiş ve bulk setlerin birbirlerine olan r değeri (benzerlik oranı) 0.74617 olarak bulunmuştur (Şekil 3).

Kaynaklar

- Akbulut, B., Karakurt, Y., Tonguç, M., 2014. Fasulye genotiplerinin morfolojik ve fenolojik karakterizasyonu, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 30(4):227-233.
- Doyle, J.J, Doyle J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. Phytochem. Bull. 19: 11-15.
- Ekinci, A., 2012. Van gölü havzası fasulye genotipleri arasındaki akrabalık ilişkilerinin ve antraknoz (*Colletotrichu lindemuthianum*) (Sacc. & Magnus Lambs. Scrib.) hastalığına dayanıklılığın fenotipik ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi. Doktora Tezi. YYÜ. Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Escoribano, M.R., Santalla, M., Casquero, P.A., Ron, A.D.E., 1998. Patterns of genetic diversity in landraces of common bean (*Phaseolus*

- vulgaris* L.) from Galicia, Plant Breeding, 117:49-56.
- Hakkı, E.E., Yorgancılar, M., Atalay, E., Uyar S., Babaoğlu M., 2007. Basit tekrarlı diziler arası polimorfizm (BTDAP=ISSR) tekniği ile yerli lüpen genotiplerinde (*Lupinus albus* L.) genetik varyasyonun belirlenmesi. Bitkisel Araştırma Dergisi, 2: 1-5.
- Işık, R., 2012. Bazı taze fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) genotiplerinin morfolojik ve moleküler karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Ortega, M.G.P., 2014. Exploration of genetic variability of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces through ISSR markers. Athens J. of Natural & Formal Sciences. Covarrubias.
- Rodino, A.P., Santalla, M., Montero, I., Casquero, P.A., De Ron, A.M., 2001, Diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm from Portugal. Genetic Resources and Crop Evolution, 48: 409-417.
- Singh, S.P., 2001. Broadening the genetic base of common bean cultivars: A Review. Crop Science, 41: 1659-1675.
- Sözen, Ö., 2006. Artvin ili yerel fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) populasyonlarının toplanması, tanımlanması ve morfolojik varyabilitesinin belirlenmesi. Doktora Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Tan, A., 1998. Current status of plant genetic resources conservation in Turkey. The Proceedings of International Symposium on In Situ Conservation of Plant Genetic Diversity (Ed. Zencirci ve ark.) Ankara, 5-16.
- Tan, A., Açıkgöz, N., 2002. *In Situ* and on-farm conservation of legume land races in Turkey. 117-120., In Report of A Working Group On Grain Legumes. Third Meeting, 5-7 July 2001, Krakow, Poland
- Türkmen, Ö., Erdinç, Ç., Şensoy, S., 2013. Türkiye'nin bazı fasulye genotiplerinin çeşitli bitkisel özelliklerinin belirlenmesi. YYÜ., Tar. Bil. Derg., 23(2): 112-125.

Çizelge 1. Bulk setlerde kullanılan ISSR primerlerinin bant bilgileri

Kullanılan Primerler	BULK-1			BULK 2		
	Skorlanan Fragman	Polimorfik Fragman	Polimorfizm Yüzdesi	Skorlanan Fragman	Polimorfik Fragman	Polimorfizm Yüzdesi
F1	4	2	50	4	2	50
F2	9	9	100	10	10	100
F3	3	2	66.6	3	3	100
F4	3	2	66.6	3	2	66.6
F5	5	3	60	4	3	75
F7	4	3	75	4	3	75
F8	3	2	66.6	3	2	66.6
F9	2	1	50	2	1	50
M1	5	5	100	5	5	100
M2	6	5	83.3	7	6	85.7
M3	8	8	100	8	8	100
M4	4	3	75	4	3	75
M5	11	11	100	11	11	100
M7	4	4	100	4	4	100
M8	5	5	100	5	5	100
M10	6	6	100	7	7	100
M12	6	6	100	6	6	100
M13	4	3	75	4	3	75
M15	9	8	88.8	9	8	88.8
M17	9	9	100	9	9	100
M18	7	7	100	7	7	100
TOPLAM	119	104	87.3	121	108	89.25

