

Melezleme ile Elde Edilen Bazı Üzüm(*Vitis vinifera* L.) Çeşit ve Çeşit Adayları ile Bunların Ebeveynlerinin RAPD Tekniği ile Tanımlanmaları

Arif ATAĞ¹ Gökhan SÖYLEMEZOĞLU²

¹ Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü-YALOVA-atakarif@gmail.com

² Prof.Dr.Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü- ANKARA

ÖZET

Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nde 20 yılı aşkın bir süre sonucunda melezleme ıslahı yolu ile ülkemiz bağcılığına kazandırılan 7 çeşit adayı ve 8 yeni çeşit ile bunların toplam 15 adet olan ebeveynlerinin genetik düzeyde karşılaştırılmaları yapılmıştır. Bu amaçla moleküler yöntemlerden PCR- RAPD tekniği kullanılarak, 20 farklı primer ile 30 çeşit ve çeşit adayının oluşturduğu benzerlik indeksi verileri kullanılarak, genetik ilişki dendogramı oluşturulmuştur.

Çeşit ve çeşit adaylarının birbirleri ve ebeveynleri ile farklı düzeylerde oluşturdukları genetik benzerlik oranları ortaya konularak, tanımlamaları yapılmıştır. En iyi polimorfizm veren primerler P 123, BC 340, P 232 ve OPF 06 primerleri olmuştur. Toplam 20 primerin oluşturdukları bant büyüklükleri 200-1800 bp arasında olmuştur. Çeşit ve çeşit adaylarının birbirleri ve ebeveynleri ile 0.610-0.780 arasında değişen oranlarda genetik benzerlik göstermiştir.

Anahtar kelimeler: RAPD, Polimorfizm, DNA, Melezleme, *Vitis vinifera* L.

ABSTRACT

Identification of Some Grape Cultivars, Hybrids and Their Parents by RAPD Technique

This research was conducted to characterize 15 grapevine hybrids and their parents by using Random Amplified Polimorphic DNA (RAPD) markers. Hybrids were obtained from Atatürk Horticultural Central Research Institute with hybridization program. 20 different decamer primers were used during the research. The genetic relationship was estimated based among cultivars and cultivar candidates on similarity index and cluster analysis.

The lowest similarity obtained between "Uslu" and other grape cultivars and hybrids. The highest similarity (0.780) was obtained between "Atasarısı" and "Yalova İncisi" grape cultivars. Utilizing cluster analysis, only one cultivar which is "Uslu" was classified in the first branch of dendogram while other cultivars and hybrids classified in the second branch. The average similarity between hybrids and parents were obtained from 0.610-0.780. P 123, BC 340, P 232 and OPF 06 primers showed more polimorphic bands than the other primers. Also P 123, BC 340, P 232, P 402, OPF 05, OPA 04 ve OPA 2 primers showed more number of bands than others. Amplified fragment ranged from 200-1800 bp and the number of bands for each primer varied 2 to 13.

Key Words: RAPD, Polymorphism, Hybrids, *Vitis vinifera L.*, Molecular Characterization.

GİRİŞ

Bağcılık çok uzun yıllardır dünya üzerinde varolmuş bir tarım dalıdır. Elverişli iklim koşullarına sahip olmasından dolayı ülkemizde çok eski bir geçmişi olduğu gibi, aynı zamanda da asmanın gen merkezidir. Üzüm meyvesinin sofralık, şaraplık, kurutmalık ve meyve suyu olarak çok yönlü değerlendirilebilmesi nedeniyle bağcılık önemini günümüze kadar korumuştur. Ülkemizde bağcılığın geliştirilmesi amacıyla yapılan çalışmalar son 30 yıl içerisinde büyük bir hız kazanmasına rağmen henüz halen arzu edilen seviyelerde değildir. Yapılan araştırmalar neticesinde *Vitis vinifera L.* türünün 30.000 civarında çeşidinin mevcut olduğu ancak bunların yarıya yakın bir kısmının genetik anlamda farklı olabileceği düşünülmektedir. Bu sebeple mevcut tür ve çeşitler arasındaki farklılığı tam anlamıyla ortaya koyabilecek genom düzeyindeki araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Biyoteknolojinin sağladığı imkanların asma ıslahında kullanılmaya başlanması ile birlikte günümüzde ıslah kavramı önemli bir değişim süreci içerisinde. Bu konuda ilk olarak izoenzimlerle tanımlama çalışmaları yapılmış daha sonra DNA ve PCR'a dayalı markörler kullanılmaya başlanmıştır (Uzun ve İter, 1993; Ağaoğlu vd., 1995; Söylemezoğlu vd., 2001).

Bu çalışmada da PCR teknolojisine dayalı olan RAPD(Random Amplified Polimorphic DNA) tekniği kullanılmıştır. RAPD, DNA amplifikasyon temeline dayanmakta ve DNA'daki nükleotid dizilimindeki farklılığı belirleme esasına dayanmaktadır. 9-10 baz uzunluğundaki rasgele oligonükleotidlerin(primerlerin), kalıp(template) DNA'nın iki iplikçisi üzerinde, birbirine karşıt iki farklı noktada tamamlayıcılarını(komplementlerini) bularak, bu ara bölgenin çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) esas alan nükleotid dizi polimorfizminden oluşmaktadır. Rasgele nükleotid diziliminden oluşan tek bir primer kullanılır. Farklılığı daha iyi yakalamak için fazla sayıda primer kullanmak gerekmektedir. RAPD tekniğinin uygulanmasının kolay olması, hızlı sonuç vermesi, diğer tekniklere göre ucuz ve radyoaktif madde içermeyen bir teknik olması nedeniyle birçok laboratuvarında sıkça kullanılan moleküler tekniklerden biri olmuştur. Bu markör sistemi ile Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nde 20 yılı aşkın bir süre sonucunda melezleme ıslahı yolu ile ülkemiz bağcılığına kazandırılan 7 çeşit aday ve 8 yeni çeşit ile bunların toplam 15 adet olan ebeveynlerinin genetik düzeyde karşılaştırılmaları yapılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Araştırmanın analizleri 2001-2003 yılları arasında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvarları ile Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü(YABKMAE) Biyoteknoloji Laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışma Yüksek Lisans tez projesidir. Araştırma materyali olarak melezleme ıslahı yolu ile elde edilen 7 adet çeşit aday ve 8 adet yeni çeşit(melezleme ıslahı yolu ile YABKMAE 'de elde edilen) ile beraber bunların ebeveyni olan 15 adet standart üzüm çeşidinin genç sürgün ve yaprakları kullanılmıştır. Bu adı geçen çeşit ve çeşit adayları ile ebeveynlerin sürgün ve yaprakları Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü Bağından temin edilmiştir.

Tablo 1. Yalova Atatürk Bahçe Kùltürleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nde melezleme çalışması sonucunda elde edilen çeşit ve çeşit adaylarının genel özellikleri

ÇEŞİT- ÇEŞİT ADAYI	KOMBİNASYONU	TANE İRİLİĞİ, KABUK RENGİ VE ÇEKİRDEK	OLGUNLAŐMA ZAMANI
91/3 Çeşit Adayı	Alfons X Muscat R. Vignes	Normal, koyu kırmızı 2-3	Geç Mevsim
5/2 Çeşit Adayı	Siyah Gemre X Cardinal	Normal, beyaz renkli 1-3	Erkenci
7/1 Çeşit Adayı	İsken.Misketi X Beyaz Şam	Normal, açık sarı 1-3	Erkenci
43/1 Çeşit Adayı	Beyaz Şam X Müşküle	İri, açık sarı, 2-3	Orta Mevsim
ÇH1 Çeşit Adayı	Çavuş X Ham. Misketi	Normal, koyu sarı 2-3	Geç Mevsim
70/1 Çeşit Adayı	Hafızali X Cardinal	İri-yuvarlak taneli, sarı renkli 1-3	Erkenci
95/3 Çeşit Adayı	Siyah Gemre X Royal	Normal, siyah renkli 1-3	Orta Mevsim
Yalova Misketi	Royal X Perle de Csaba	Normal, siyah renkli, 2-3	Erkenci
Yalova Ata sarısı	Çavuş X Cardinal	Çok iri, sarı , 2-3	Orta-Geç
Ergin Çekirdeksizi	Beyrut Hurması X Perlette	Ufak, beyaz renkli, çekirdeksiz	Erkenci
Samancı Çekirdeksizi	Beyaz Şam X Perlette	Normal, sarı renkli, çekirdeksiz	Geç Mevsim
Yalova İncisi	Hönüsü X Siyah Gemre	İri, beyaz renkli, 2-3	Çok Erken
Uslu	Hönüsü X Siyah Gemre	Normal, kırmızı, 2-3	Çok Erken
Yalova Çekirdeksizi	Beyrut Hurması X Perlette	İri, beyaz renkli, çekirdeksiz	Orta Mevsim
Yalova beyazı	Beyaz Şam X Cardinal	İri taneli,açık sarı renkli,1-3	Orta Mevsim

Çalışmada kullanılan melez üzümlerin özellikleri Tablo 1'de verilmiştir. Bunların ebeveyni olan standart çeşitler ise Cardinal, Müşküle, Beyaz Şam, Siyah Germe, Alfons, Royal, Beyaz Çavuş, Hafızali, Hamburg Misketi, Muscat Rein Des Vignes, İskenderiye Misketi, Perle de Csaba, Hönüsü, Perlette ve Beyrut Hurmasıdır. Araştırmada PCR-RAPD tekniği esas alınarak; 20 farklı primerin üzümler ve çeşit adaylarının ebeveynleri ve birbirleriyle genomik düzeyde benzerlikleri araştırılmıştır. RAPD yöntemi 4 ana aşamadan oluşmakta olup bu aşamalar ve yapılan uygulamalar sırasıyla şunlardır; DNA izolasyonu, PCR uygulaması, agaroz jel elektroforezi ve sonuçların değerlendirilmesi.

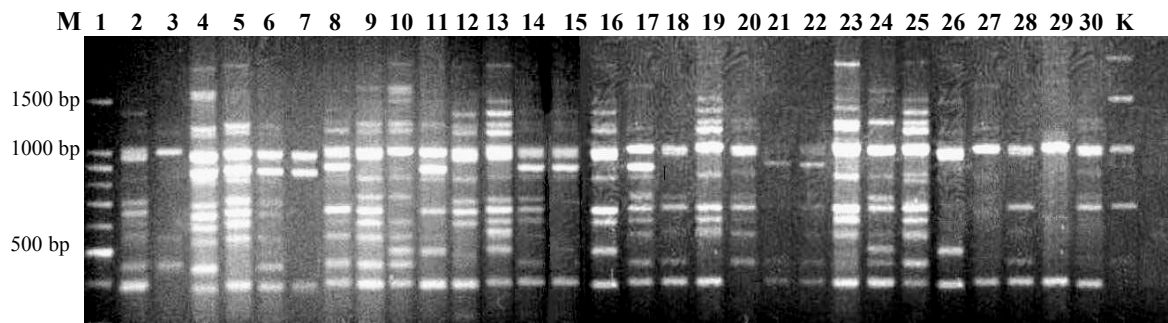
Araştırmada kullanılacak en uygun izolasyon yöntemini belirlemek amacıyla yapılan literatür taraması neticesinde DNA miktarı ve saflığı açısından en iyi sonucu veren Lodhi ve ark. (1994) tarafından geliştirilen metot seçilmiştir. Bu yöntemde göre sürgün ucundaki yarı açılmış genç yapraklar kullanılarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ekstrakte edilmiş olan DNA'ların miktarı ve saflıkları spektrofotometre ile belirlenmiştir. PCR uygulamaları 25 µl'lik miktarlarda gerçekleştirilmiştir. Her bir reaksiyon karışımı 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, %0.1 Triton X-100, 120µl dNTP, 0.4µl primer, 100-200 mg genomik DNA ve 0.5 ünite Taq-Polimeraz içermiştir. Ayrıca her örneğe 1 damla mineral yağ damlatılmıştır. DNA amplifikasyonu için örnekler 40'ar devir olacak şekilde 1 dakika 94°C'de, 2 dakika 35°C'de ve 2 dakika 72°C'de ve bunu takiben 8 dakika 72°C'de tutulmuşlardır. RAPD-PCR tekniği ile elde edilen amplifikasyon ürünleri % 2'lik agaroz jelde (%1 agaroz + %1 Nusieve GTG agarose) ve 1x TBE tampon çözeltisi içerisinde 100V'da yaklaşık 4 saat koşurulmuştur. Daha sonra ethidium bromide ile boyanmış ve UV ışık altında (λ=302 nm) Gel görüntüleme programı(Gelgrab) ile farklı primerlerin kullanılmasıyla 30 adet bireyde elde edilen

amplifikasyon ürünleri(bantlar) üzerinde polimorfizm araştırılmıştır. Böylece bireylerin birbirleri ve ebeveynleri ile olan benzerlikleri oluşturulan dendogram ve benzerlik indeksi ile ortaya konulmuştur. Oluşan bantlar çeşitlerde ortak (monomorfik) veya farklı(polimorfik) olma durumlarına değerlendirmeye alınmıştır. Bantların çeşitlerde bulunma durumuna göre var ise “1” yoksa “0” şeklinde değerlendirilerek benzerlik indeksinin oluşturulmasında kullanılmıştır. Bu amaçla Sokal ve Sneath(1963) tarafından geliştirilen Benzerlik İndeksi(B.İ.) formülü iki birey arasındaki benzerliğin karşılaştırılmasında kullanılmıştır.

Çeşit ve çeşit adayları arasındaki genetik benzerliklere dayalı dendogram verileri ise, Rohlf (1990) tarafından geliştirilen NTSYC-ps (Numerical Taxonomy and Multivariation Analysis System, Version 1.80) programı kullanılarak “UGCMA cluster” analizi ile belirlenmiştir.

3. BULGULAR ve TARTIŞMA

Yalova Atatürk Bahçe Kùltürleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nde (YABKMAE) yapılan melezleme çalışmaları sonucunda elde edilen 8 yeni üzüm çeşidi, 7 çeşit adayı ve bunların ebeveyni olan 15 standart üzüm çeşidinin DNA'ları; miktar ve saflık açısından en iyi sonucu veren, Lodhi ve ark. (1994) tarafından geliştirilen yöntemle göre izole edilmiştir. Sürgün ucundaki yarı açılmış genç yapraklar DNA izolasyonu için kullanılmıştır. Uygulanan izolasyon yöntemi ile yüksek oranda DNA elde edilmiş ve elde edilen bu DNA'larında 1.62-1.81(A260/A280) arasında değişen saflık değerlerine sahip olduğu görülmüştür.Çeşit ve çeşit adaylarından elde edilen saf DNA'ların 20 farklı RAPD primeri ile moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Primerlerin seçimi ve değerlendirilmesinde daha önce araştırmacılar tarafından denenmiş ve yüksek oranda polimorfizm verdiği belirtilen primerler seçilmiştir. Bu primerler içinden de ön denemeler sonucunda en iyi sonucu veren 20 RAPD primeri denemede kullanılmıştır. Bunlardan en iyi polimorfizm verenler P 123, BC 340, P 232 ve OPF 06 primerleri olmuştur(Şekil 1). Bant sayısı ise P 123, BC 340, P 232, P 402, OPF 05, OPA 04 ve OPA 2 primerlerinde fazla bulunmuştur.

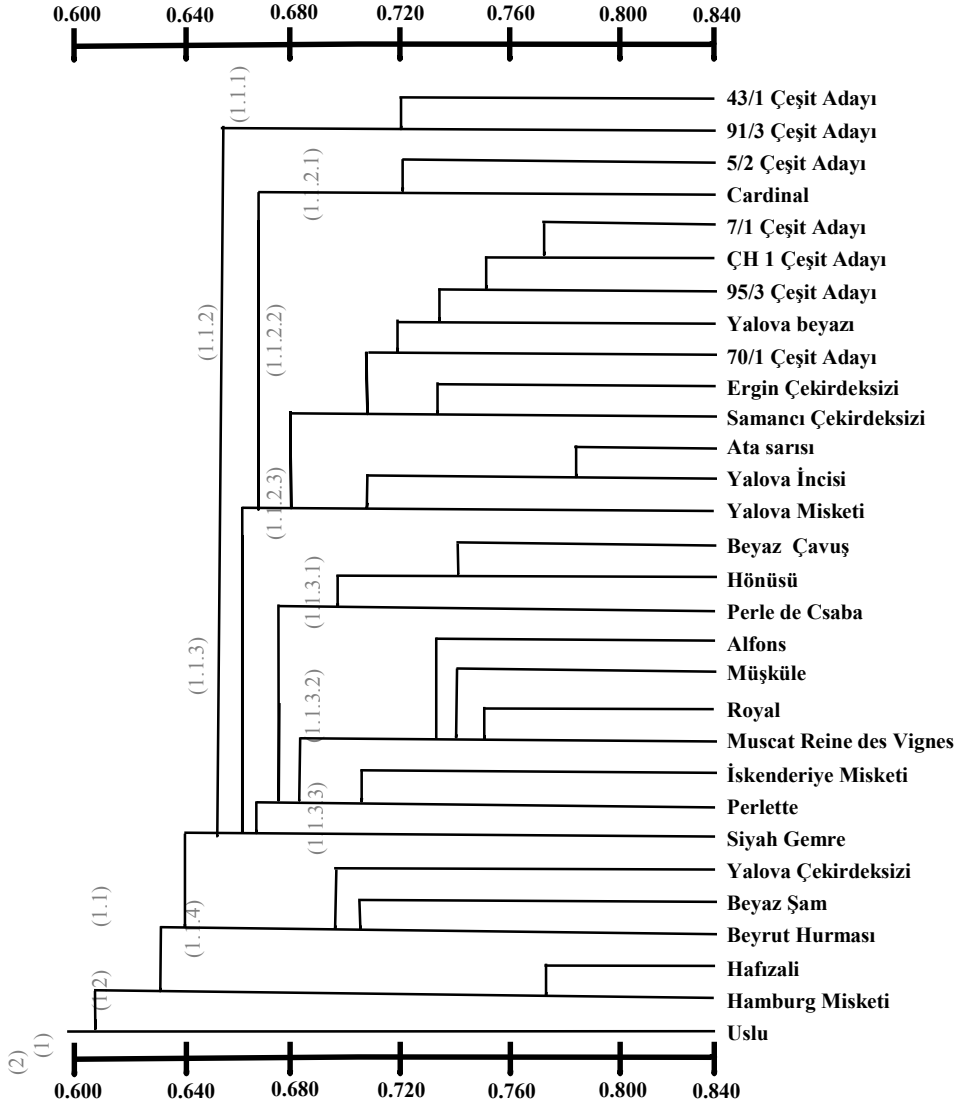


Şekil 1. Araştırmada kullanılan üzüm çeşit ve çeşit adaylarının P 123 primeri ile oluşturulan PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüleri. M: Markör-100 bp DNA Ladder, 1: 43/1, 2:91/3, 3: 5/2, 4:7/1, 5: ÇH 1, 6: 70/1, 7: 95/3, 8: Yalova Misketi, 9: Yalova Beyazı, 10: Yalova Ata sarısı, 11: Ergin Çekirdeksizi, 12: Samancı Çekirdeksizi, 13: Yalova İncisi, 14: Uslu, 15: Yalova Çekirdeksizi, 16: Cardinal, 17: Müşküle, 18: Beyaz Şam, 19: Siyah Germe, 20: Alfons, 21: Royal, 22: Beyaz Çavuş, 23: Hafızali, 24: Hamburg Misketi, 25: Muscat Rein Des Vignes, 26: İskenderiye Misketi, 27: Perle de Csaba, 28: Hönüsü, 29: Perlette, 30: Beyrut Hurması, K: Kontrol

Denemede kullanılan bütün primerler dikkate alındığında bant büyüklükleri 200-1800 bp arasında olmuştur. Benzerlik indeksi formülüne göre oluşan bantlar değerlendirilerek, benzerlik indeksi tablosu

oluşturulmuştur. 30 çeşit ve çeşit adayına ait benzerlik indeksi değerleri NTSYS-pc programında değerlendirilerek, “UPGMA Cluster” analizi ile benzerlik dendogramı oluşturulmuştur.

Çizelge 3. Araştırmada kullanılan üzüm çeşit ve çeşit adaylarına ait genetik ilişki dendogramı



Bu çeşit ve çeşit adaylarının ebeveynleri ile aralarında 0.610-0.770 arasında değişen oranlarda bir genetik benzerlik bulunmuştur. Tüm çeşit ve çeşit adayları dikkate alındığında ise benzerlik değerlerinin 0.610-0.780 arasında olduğu görülmüştür. Aynı ebeveynlere sahip olduğu belirtilen çeşit ve çeşit adaylarının aralarında çok yüksek bir genetik benzerlik bulunmamıştır. Ayrıca yeni çeşitlerden Ata sarısı ile Yalova İncisi arasında farklı ebeveynlere sahip olmalarına rağmen 0.780 oranında genetik benzerlik bulunmuştur. Ampelografik olarak birbirinden farklı olan çeşit ve çeşit adayları ile bunların ebeveynlerinin bu farklılığa bağlı olarak genetik düzeyde de farklılık gösterdiği anlaşılmıştır.

Benzerlik dendogramına bakıldığında Uslu ve diğer çeşitlerden oluşan 2 ana grup (1 ve 2) olduğu görülmektedir. 1 ile gösterilen grubunda kendi içinde 2 alt gruba (1.1 ve 1.2) 0.63 benzerlik oranı ile ayrıldığı, 1.1 grubunun da 4 alt gruba (1.1.1, 1.1.2, 1.1.3 ve 1.1.4) ayrıldığı görülmektedir. 1.1.2 alt grubu 3 alt gruptan (1.1.2.1, 1.1.2.2 ve 1.1.2.3) oluşmaktadır. İlk grupta oldukça iri, beyaz taneli ve erken

mevsimde olgunlaşan 5/2 çeşit adayı ve bunun ebeveynlerinden olduğu belirtilen ve gene erken mevsimde olgunlaşan iri taneli Cardinal çeşidi bulunmaktadır. Aralarındaki benzerlik oranı da 0.720 dir. 1.1.2.2 alt grubunda toplam 7 çeşit ve çeşit adayı bulunmaktadır. Bu çeşit adayları ve çeşitlerden bazıları ortak ebeveynlere sahiptir. Ayrıca Ergin Çekirdeksizi ve Samancı Çekirdeksizinin melezlemesinde ana hat olarak Perlette çeşidinin kullanıldığı belirtilmektedir (Uslu ve ark. 1995, Atak ve Yalçın 2002). 1.1.2.3 alt grubu en yüksek benzerlik düzeyinin görüldüğü grup olup, burada yer alan çeşitler yakın tarihlerde tescil edilmişlerdir. Bunların ayrıca farklı ebeveynlere sahip oldukları bilinmektedir. 1.1.3 alt grubunun da 3 alt gruptan (1.1.3.1, 1.1.3.2 ve 1.1.3.3) oluştuğu görülmektedir. Bu gruplarda genellikle farklı mevsimlerde olgunlaşan standart sofralık üzüm çeşitleri yer almıştır.

Benzerlik dendogramı genel itibari ile değerlendirildiğinde çeşit adaylarının, yeni çeşitlerin ve bunların ebeveynlerinin birbirleri ile 0.610-0.780 arasında değişen oranlarda genetik benzerlik göstermekte olduğu görülmektedir. Melez çeşitler ile ebeveynlerini arasında ise 0.610-0.770 düzeyinde bir benzerlik bulunmuştur. Bu durum aralarında çok yüksek bir genetik benzerlik olmadığını göstermiştir. Benzer şekilde aynı ebeveynlere sahip olan Uslu, Yalova İncisi, Yalova Çekirdeksizi ve Ergin Çekirdeksizi arasında da çok yüksek bir benzerlik bulunmamıştır.

Bu sonuçlar ışığında, melez çeşitler ve bunların ebeveynleri ile olan benzerlik oranlarının değerlendirilmesinde RAPD yönteminin kullanılması halinde kullanılan primer sayısının artırılması veya yeni geliştirilen moleküler markör yöntemlerinin (SSR gibi) kullanılması daha uygun görülmektedir. RAPD yönteminin kullanılması halinde mümkün olduğunca fazla sayıda primer ile çalışılması gerekmektedir. Primer sayısının artması yapılan analiz çalışmalarında ki hata ihtimalini en aza indirecektir. Az sayıda primer ile çalışmak bu gibi çalışmalarda hata ihtimalinin yüksek olmasına sebebiyet verebilmektedir. Ayrıca yurtdışında yaygın olarak kullanılan; yüksek bütçeli projeler yaparak, farklı laboratuvarlar da sonuçların karşılaştırılması uygulaması da analizlerdeki hata ihtimalini en aza indirebilmektedir.

YARARLANILAN KAYNAKLAR

- Ağaoğlu, Y.S., Söylemezoğlu, G., Ergül, A. ve Çalışkan, M. 1995. Ülkemizde yetiştirilen bazı sofralık üzüm çeşitlerinin izoenzim bantlarından yararlanılarak elektroforez tekniği ile tanımlanmaları. Türkiye 2. Bahçe Bitkileri Ulusal Kongresi, Cilt 2 (Sebze- Bağ – Süs Bitkileri); 567-571. 3-6 Ekim 1995, Adana.
- Lodhi, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F. and Reisch B.I. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. Plant Mol. Bio. Rep. 12 (1); 6-13.
- Rohlf, F. J. 1990. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 1.8. Applied Biostatistics, Newyork.
- Sokal, R.R. and Sneath, P.N.A. 1963. Principles of Numerical Taxonomy, Freeman, San Francisco.
- Söylemezoğlu, G., Ağaoğlu, Y.S., and Uzun, H.İ. 2001. Ampelographic characteristics and isoenzymic analysis of *Vitis vinifera* spp. *sylvestris* in Southwestern Turkey. Biotechnology & Technological Equipment. 15/2001/2, 106-113. Diagnosis Press. ISSN, 1310-2818.
- Uzun, İ. ve İlter, E. 1993. Bazı üzüm çeşitlerinin yapraklarındaki peroksidaz ve kateşol oksidaz izoenzimlerinden teşhisi üzerinde araştırmalar. Ege Üni. Ziraat Fak. Derg. 30(3):105-111.