



Beyaz Nektarin Tiplerinin AFLP Moleküler Markör Polimorfizminin *Prunus* Cinsine Giren Önemli Türlerle Karşılaştırılması

Engin GÜR^{1*}, Murat ŞEKER²

¹Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lapseki Meslek Yüksekokulu, Çanakkale

²Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Çanakkale
*e-posta: engingur@comu.edu.tr Tel: 0 286 522 61 04

Geliş Tarihi: 10.07.2012, Kabul Tarihi: 30.11.2012

Özet: Bu çalışmada beyaz nektarin tiplerinin diğer *Prunus* cinsine giren şeftali, nektarin, kiraz, kayısı, badem ve erik ile genetik akrabalık oranları belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla şeftali (Royal Glory), kiraz (Premier Giant), kayısı (Roxana), badem (Texas), nektarin (Caldesi 85), erik (Black Diamond) ve beyaz nektarin (17-BN-01 ve 17-BN-02) genotipleri kullanılmıştır. Genetik akrabalık oranlarını belirlemek için AFLP analizi yapılmıştır. AFLP analizlerinde 6 primer kombinasyon kullanılmış, toplam 282 AFLP fragment elde edilmiştir. AFLP analizleri sonucunda beyaz nektarin tiplerinin diğer şeftali ve nektarin çeşitlerinden farklı genetiksel özelliklere sahip olduğu görülmüştür. Hazırlanan dendrogramda beyaz nektarin tipleri birbirine genetik olarak en yakın bulunurken, kiraz çeşidi en uzak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Beyaz Nektarin, AFLP, Moleküler Markör.

Comparison of AFLP Polymorphism White Nectarine Types with Important *Prunus* Species

Abstract: In this study, the genetic relationships were identified among white nectarine (17-BN-01 and 17-BN-02), peach (Royal Glory), cherry (Premier Giant), apricot (Roxana), almond (Texas), nectarine (Caldesi 85) and plum (Black Diamond) genotypes within observed the *Prunus* species. For this purpose, 282 AFLP fragments were marked by AFLP analyses, using 6 primer combinations. The results of AFLP analysis have brought out the different genetic characters of white nectarine types from other peach and nectarine varieties. In dendrogram, the genetic distance of white nectarine types were found to be similar, although cherry species were found to be must distant from the genetic of white nectarines

Key Words: White Nectarine, AFLP, Molecular Marker.

Giriş

Çanakkale ili meyve yetiştiriciliği bakımından ülkemizde önemli bir yere sahiptir. Bursa, Mersin ve İzmir illerinin ardından en fazla şeftali ve nektarin yetiştiriciliği ilimizde gerçekleştirilmektedir (Özçağırın ve ark., 2011). Son yıllarda Rusya'ya olan ihracatımızın artması nedeniyle bölgemizde şeftali ve nektarin tesislerinde hızlı bir artış gözlenmektedir. Çanakkale yöresinde özellikle Lapseki ve Bayramiç ilçeleri kaliteli şeftali yetiştiriciliği bakımından özel öneme sahiptir. Bu ilçelerde Dixired, Redhaven, Glohaven, Cresthaven, Blake, J.H. Hale, Monreo, şeftali çeşitleri ve Fantasia, Armking, Summer Super Star, Big Top, Caldesi 2000, Venüs, Silver King gibi nektarin çeşitleri yaygın bir şekilde yetiştirilmektedir. Ticari olarak yetiştiriciliği yapılan bu çeşitlere ek olarak Çanakkale yöresinde beyaz nektarin olarak bilinen tiplerin de yetiştiriciliği dikkat çekicidir. Ülkemizde sadece Çanakkale ilinin Bayramiç ve Lapseki ilçelerinde ticari olarak yetiştiriciliği yapılan ve değişik tiplerden oluşan bir populasyon özelliği taşımaktadır. Meyveleri Temmuz sonu ile Eylül başı arasında olgunlaşmaktadır. Beyaz nektarin popülasyonu özellikle Bayramiç ilçesine bağlı Evciler beldesinde yoğunluk göstermektedir. Son yıllarda İstanbul ve İzmir gibi büyük şehirlerde yüksek fiyatlarla alıcı bulması nedeniyle yetiştiriciliği önemli bir düzeye ulaşmıştır.

Son zamanlarda kullanılmaya başlanan AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism – Çoğaltılan Parça Uzunluğu Farklılığı) (Vos ve ark., 1995) ve SSR (Simple Sequence Repeats – Basit Dizi Tekrarları) teknikleri en fazla gündemde olan moleküler markör teknikleridir (Wu ve Prior, 2005).

AFLP tekniğinin polimorfizm oranı çok yüksek olup çok sayıda lokusu aynı anda ve etkili bir şekilde taraması nedeni ile parmak izi analizine çok uygundur. AFLP analizleri ile heterozigot ve homozigot bireyler arasındaki farklılıklar saptanabilmektedir. Çoğunlukla dominant markörler vermesi ve farklı genetik haritalar arasında transferinin güç olması AFLP tekniğinin en önemli dezavantajlarından (Kaçar, 2001).

Geuna ve ark. (2003), kayısı türlerinde toplam 118 birey üzerinde AFLP tekniğini kullanarak DNA parmak izi çalışmaları yapmışlardır. Araştırmacılar 5 primer kombinasyonu kullanarak 165 polimorfik bant elde etmiş, çeşit ve türler arasındaki farklılıklar ile akrabalık durumlarını ortaya çıkarmışlardır. Bu analizlerin sonucunda Akdeniz, Çin, Avrupa ve Avrupa-Kuzey Amerika karışımı 4 temel grup belirlenmiştir.

Prunus türlerinde de AFLP yöntemi parmak izi çalışmaları için kullanılmıştır (Aranzana ve ark., 2003). Kuzey ve Güney Amerika, Avrupa ve İspanya'da yetiştirilen 210 nektarin ve şeftali çeşitlerinin AFLP yöntemiyle DNA parmak izi analizleri yapılarak genetik çeşitlilik durumlarına bakılmıştır. Bu çalışma sonucunda 9 AFLP primeri ile 297 bant sayılmıştır, 47 tanesi polimorfizmi göstermiştir. 210 çeşit içinden %93 oranıyla 196 farklı genotip tanımlanarak AFLP analizlerinin şeftalilerde polimorfizmi belirlemede etkili olduğu kanısına varılmıştır.

Aradhya ve ark. (2004), *Prunus* türüne ait 7 kültür ve 7 yabani çeşit arasında genetik çeşitliliği ve farklılığı ortaya çıkarmak amacıyla AFLP analizleri yapmışlar. Sonuçta *Amygdalus*, *Armeniaca*, *Cerasus*, *Prunophora* ismiyle tanımlanan 4 şube açığa çıkarmışlardır. *Armeniaca Prunus*'un alt cinsi olan "Prunophora" türünden farklılıklar göstermiş, tür içinde moleküler varyasyon kayısında (0.0529) olurken kayısıyı, hekzaploid erik (0.0359), badem (0.0330), kiraz (0.0310), diploid erik (0.0303), şeftali (0.0263) takip etmiştir.

Süs şeftalisi (*Prunus persica* (L.) Batsch) ile yapılan çalışmada *Prunus persica* ve *Purunus davidiana* çeşitlerinden oluşan 51 süs şeftalisinde AFLP markörleri kullanılarak genetik ilişkiler belirlenmeye çalışılmış; Çin, Japonya ve Amerika'dan alınan süs şeftalisi örneklerinde 6 EcoRI/Msel AFLP primer çifti kullanılmış toplamda 275 markör elde edilmiştir (Hu, 2005). Aralarında 265 bant polimorfik olmuş, her sınıf için toplam markörler 90'dan 140'a doğru sıralanmıştır. PAUP-UPGMA ağacında kökenleri aynı olan 2 grup belirlenmiş, *Prunus davidiana* türü *Prunus persica* grubunun dışında bulunmuştur. *Prunus persica* grubunda 20 süs şeftalisinden 18'i aynı grupta yer almıştır. 5 bodur kültür çeşidi aynı kökene sahip grupta yer alarak %81'i gen havuzundaki çeşitlerden ayrılmışlardır. Bu sonuçlar AFLP markörlerinin süs şeftalisindeki genetik ilişkisini belirleyebilmek için çok güçlü markörler olduğunu göstermiştir.

Xu ve ark. (2006), 23 Japon şeftali çeşidi arasındaki genetik ayrımı ve genetik bağlantıyı belirleyebilmek amacıyla 16 AFLP primer kombinasyonu kullanmışlar ve toplamda 837 bant, 146 polimorfik bant elde ederek polimorfizm oranını %17.5 bulmuşlardır.

Eroğul (2009), Türkiye'de bulunan idris tipleri morfolojik ve moleküler düzeyde belirleyerek aralarındaki farklılıkları ortaya koymuştur. Morfolojik verilere dayanarak 60 idris genotipinde oluşturulan dendrogramda 4 ana grup oluşmuş, 3 grubu kara idris grubu oluştururken, bir grubu da sarı idris genotipleri oluşturmuştur. Bu amaçla AFLP analizinde 4 primer kombinasyonu, 45 idris genotipinde kullanmış ve 14'ü monomorfik, 98i polimorfik olmak üzere, toplam 112 bant elde etmiştir. SSR yöntemi ile birbirine çok yakın bulunan genotiplerin, AFLP analizleri sonucunda oluşan dendrogramda uzak olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda beyaz nektarin tiplerinin *Prunus* cinsine giren şeftali, kiraz, kayısı, badem, nektarin ve erik çeşitleriyle genetik akrabalık ilişkilerini belirlemek için AFLP analizi yapılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Çalışmamızda kullanılan *Prunus* türünde yer alan çeşitlerin yaprakları 15 Haziran 2011 tarihinde üretici bahçelerinden ve Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi meyve parseline alınmıştır.

Yöntem

Çalışmamızda üç temel basamakta gerçekleştirilen AFLP reaksiyonları Vos ve ark. (1995), tarafından bildirilen yöntemin modifikasyonu ile uygulanmıştır. Buna göre izlenen temel aşamalar (1) *Prunus* türünde yer alan çeşitlerin genomik DNA izolasyonu (2) DNA'ların restriksiyon enzimleri ile kesimi ve adaptörlerin eklenmesi (Restriksiyon ve Ligasyon), ön çoğaltım (preamplifikasyon) ve selektif çoğaltım (selektif amplifikasyon) ve (3) sonuçların görüntülenmesi ve istatistiksel değerlendirmesi şeklinde olmuştur.

DNA İzolasyonu

Vilgays ve Gonzalez (1990)'in DNA izolasyonu yönteminin modifikasyona gidilmesiyle elde edilmiştir. DNA izolasyonu için *Prunus* türlerinde yer alan çeşitlerin yaprakları sıvı azot içeren porselen havanlarda iyice ezilerek 1.5 ml'lik eppendorf tüplere aktarılmıştır.

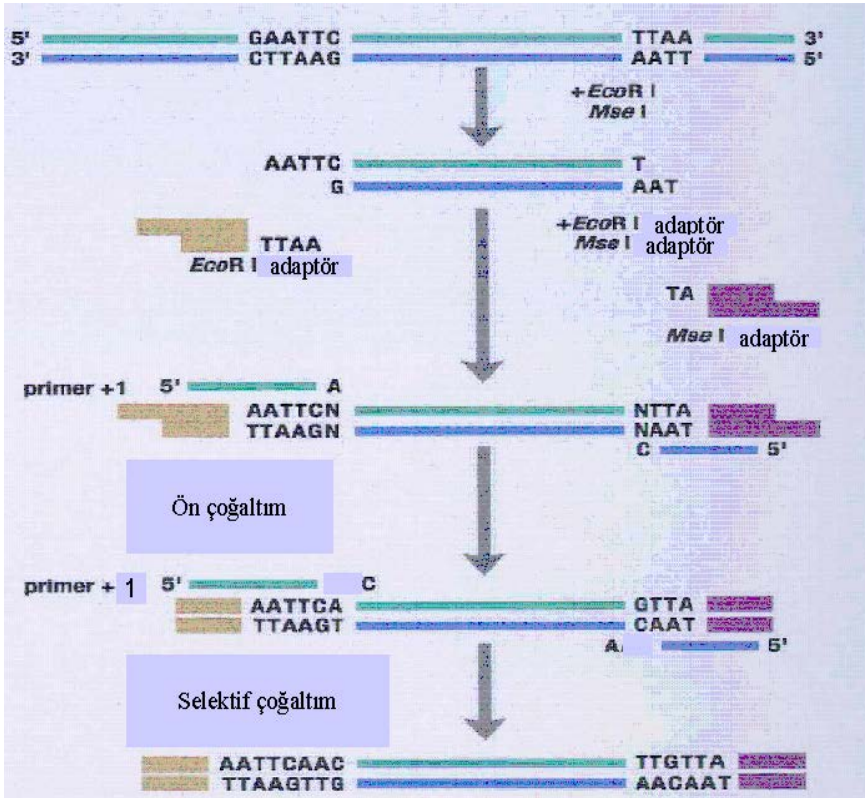
Sonra her tüpe 500 µl ekstraksiyon buffer (0.15 M NaCl, 50 mM Tris pH:8, 10 mM EDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid), %1 SDS (Sodium dodecyl sulphate), 25 µl proteinase K) konularak iyice süspanse oluncaya kadar karıştırılmıştır. Karışım daha sonra 65 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu uygulama nükleik asitlerin ekstrakte ve hidrate edilmesini kolaylaştırmaktadır. Bu inkübasyon periyodundan sonra eppendorf tüplere eşit hacimde fenol:kloroform-izoamil alkol (25:25 v/v) eklenerek 13.000 g'de 1 saat santrifüjasyona bırakılmıştır. Üste toplanan sıvının 400 µl'si yeni eppendorf tüplere aktarılarak üzerine 30 µl RNase A (10 mg/ml) ilave edilerek inkübasyona bırakılmıştır. 37 °C'de yarım saat inkübasyondan sonra 250 µl kloroform: izoamil alkol (24:1 v/v) eklenerek 15 dk santrifüj edilmiştir. Üste toplanan sıvı yeniden temiz eppendorf tüplere alınarak üzerine eşit hacim izopropanol eklenmiştir. Bir saat veya tüm gece -20 °C'de inkübasyondan sonra 5 dk santrifüj uygulanarak tüpün dip kısmında toplanan DNA pelleti 100 µl %80'lik etanol ile yıkanarak ortam koşullarında kurutulmuştur. Daha sonra elde edilen DNA pelleti 50 µl ultra saf su (d₂H₂O) içerisinde çözünerek bir sonraki aşamada kullanılmıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Çizelge 1. Selektif PCR aşamasında kullanılan primerler ve kombinasyonları

Primer adı	Dizisi 5'.....3'
E/SEL22	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAC-3'
M/SEL2	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACA C-3'
E/SEL32	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAG-3'
M/SEL2	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACA C-3'
AFLPc	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CTC-3'
M/SEL6	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACT C-3'
E/SEL22	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAC-3'
M/SEL7	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACT G-3'
AFLPd	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CTG-3'
M/SEL2	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACA C-3'
E/SEL22	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAC-3'
M/SEL6	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACT C-3'

Üç temel basamakta gerçekleşen AFLP reaksiyonlarının sonuçları Sorensen'in (1948) benzerlik indeksine (UPGMA cluster analizi-Unweighted pair group method with arithmetic averages) göre değerlendirilmiştir. Dendrogram ve benzerlik indeksinin oluşturulması aşamasında Beckman CEQ 8800 DNA Capillary Dizi Analizi aletinde PCR ürünlerinin yürütülmesi sonrasında elde edilen veriler bilgisayar ortamında var (1) yok (0) şeklinde skorlanmış ve elde edilen ham veriler Sorensen's benzerlik indeksine göre

değerlendirilmiştir. MVSP (Multi-Variate Statistical Package, version 3.1) programı kullanılarak dendrogram elde edilmiştir.



Şekil 1. AFLP tekniğinin önemli aşamaları.

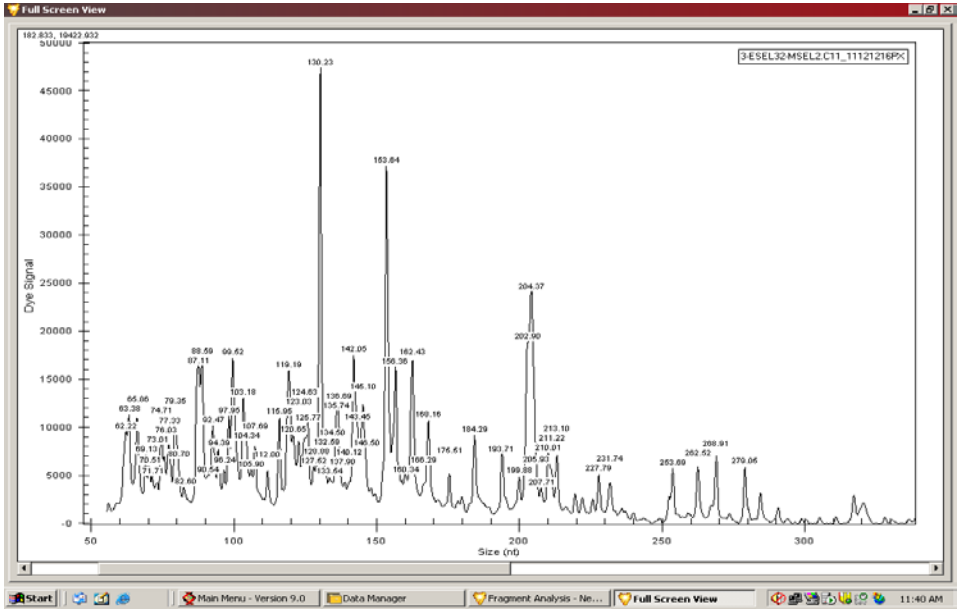
Araştırma Bulguları ve Tartışma

AFLP analizleri beyaz nektarin'in diğer *Prunus* türleriyle akrabalık derecelerini belirlemek için 6 primer çifti kullanılarak yapılmıştır. 7 *Prunus* türünde 8 genotipte (şeftali (Royal Glory), kiraz (Premier Giant), kayısı (Roxana), badem (Texas), nektarin (Caldesi 85 ve beyaz nektarin (BN-1 ve BN-2) ve Erik (Black Diamond) bantların değerlendirmesi var (1) – yok (0) şeklinde yapılmıştır. Kullanılan altı primer çiftinden toplam 282 adet AFLP fragment ve 182 adet polimorfik AFLP fragment elde edilmiştir. Polimorfik AFLP fragment oranı %67.02 olmuştur. Çizelge 2'de AFLP analizlerinde kullanılan primer çiftleri ve elde edilen 282 AFLP fragmentin primer çiftlerine göre dağılımı verilmiştir. En çok AFLP fragment sayısı ESEL22-MSEL2 primer çiftinden elde edilmiştir.

Çizelge 2. AFLP analizlerinde kullanılan primer çiftleri ve polimorfik markörlerin dağılımı

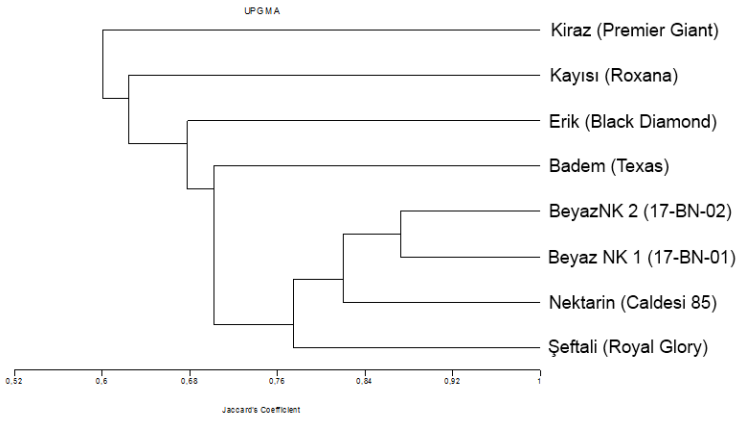
AFLP Primerleri	Toplam AFLP Fragment Sayısı	Toplam Polimorfik AFLP Fragment Sayısı	Polimorfik AFLP Fragment Oranı (%)	Fragment Aralığı (bp)
ESEL22-MSEL2	66	47	71.21	61-516
ESEL32-MSEL2	52	28	53.84	61-460
AFLPC-MSEL6	45	28	62.22	64-410
ESEL22-MSEL7	49	35	71.42	76-441
AFLPD-MSEL2	35	24	68.57	64-500
ESEL22-MSEL6	35	27	77.14	72-393
TOPLAM	282	189	67.02	-

Çalışmada AFLP parçacıklarının Beckman CEQ 8800 DNA Capillary Dizi Analizi Aletinde yürütülmesi sonucunda elde edilen piklerden örnek Şekil 2’de verilmiştir.



Şekil 2. AFLP parçacıklarının Beckman CEQ 8800 DNA Capillary Dizi Analiz aletinde yürütülmesi sonucunda elde edilen piklerin farklı görüntüleri.

Sonuçlar Sorensen’in (1948) benzerlik indeksine (UPGMA cluster analizi-Unweighted pair group method with arithmetic averages) göre değerlendirilmiştir. MVSP (Multi-Variate Statistical Package, version 3.1) programı kullanılarak dendrogram elde edilmiştir (Şekil.3).



Şekil 3. AFLP markörleri kullanılarak hazırlanan ve *Prunus* türleri arasındaki genetik benzerliği gösteren UPGMA dendrogramı.

Dendrogram sonuçlarına göre analizi yapılan *Prunus* türleri arasındaki genetik farklılıklar %57.8'e kadar düşmektedir. Genetik olarak en yakın genotipler %87.3 ile beyaz nektarin 1 ve beyaz nektarin 2 genotipleri arasında olmuştur. Beyaz nektarin genotiplerine uzaklık sırasıyla nektarin, şeftali, badem, erik, kayısı ve kiraz izlemiştir. Beyaz nektarin genotiplerine en yakın nektarin olurken en uzak kiraz olmuştur (Çizelge 3). AFLP analizleri sonucunda beyaz nektarin tiplerinin diğer şeftali ve nektarin çeşitlerinden farklı genetiksel özelliklere sahip olduğu görülmüştür.

Çizelge 3. *Prunus* türlerinde yapılan AFLP analizleri sonucunda elde edilen benzerlik indeksi

	Şeftali	Kiraz	Kayısı	Badem	Nektarin	Erik	BN1	BN2
Şeftali	-							
Kiraz	0.615	-						
Kayısı	0.589	0.582	-					
Badem	0.667	0.600	0.653	-				
Nektarin	0.761	0.606	0.624	0.702	-			
Erik	0.629	0.597	0.629	0.661	0.711	-		
BN1	0.778	0.578	0.623	0.710	0.852	0.713	-	
BN2	0.784	0.628	0.627	0.730	0.788	0.675	0.873	-

Sonuç ve Öneriler

Çalışmamızda beyaz nektarin genotiplerinin (BN-1 ve BN-2) ve diğer *Prunus* türüne giren şeftali (Royal Glory), kiraz (Premier Giant), kayısı (Roxana), badem (Texas), nektarin (Caldesi 85) ve erik (Black Diamond) çeşitleriyle akrabalık özelliklerinin ortaya koymak amacıyla AFLP markörleri başarılı bir şekilde uygulanmış ve 6 primer çiftinden toplam 282 adet AFLP fragment ve 182 adet polimorfik AFLP fragment elde edilmiştir. Polimorfik

AFLP fragment oranı %67.02 olmuştur. Elde edilen sonuçlar neticesinde dendrogram oluşturulmuştur.

Dendrogram üzerindeki bütün çeşitler içinde genetik benzerliklerine göre en düşük genetik benzerliğe sahip çeşitler 0.582 oranı ile kiraz çeşidi Premier Giant ile kayısı çeşidi Roxana, en yüksek genetik benzerlik ise 0.873 oranı ile beyaz nektarin çeşitleri arasındadır. Dendrogram üzerinde çeşitler genetik benzerlik yönünden bir birlerinden uzak kabul edilmiştir. AFLP analizleri sonucunda beyaz nektarin tiplerinin diğer *Prunus* türlerine ait çeşitlerden farklı genetiksel özelliklere sahip olduğu saptanmıştır.

Teşekkür

Çalışmaya katkılarından dolayı Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü öğretim üyesi Prof. Dr. Ali Ergül ve öğrencileri'ne teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Aradhya, M. K., Weeks, C. ve Simon, C. J., 2004. Molecular Characterization of Variability and Relationship Among Seven Cultivated and Selected Wild Species of *Prunus* L. Using Amplified Fragment Length Polymorphism. *Scientia Horticulturae* 103: 131-144.
- Aranzana, M.J., Carbo, J. ve Arus, P., 2003. Using Amplified Fragment-Length Polymorphisms (AFLP' s) to Identify Peach Cultivars , *Journal of American Society of Horticultural Science*, 128 (5): 672-677.
- Eroğul, D., 2009. Bazı İdris (*Prunus Mahaleb* L.) Genotiplerinin Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonu. Ege Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Bölümü Doktora Tezi.150 s.
- Geuna, F., Toschi, M. ve Bassi, D., 2003. The Use of AFLP Markers for Cultivar Identification in Apricot. *Plant Breeding*, Vol. 122, Iss. 6, pp 526-531.
- Hu, D.Y., Zhang, Z.S. ve Zhang, D.L., 2005. Genetic Relationship of Ornamental Peach Determined Using AFLP Markers. *Hort Science*. 40, 1782-1786.
- Kaçar, Y. A., 2001. Türkiye'de Yetiştirilen Önemli Kiraz (*Prunus avium* L.) ve Vişne (*Prunus cerasus* L.) Çeşit ve Tiplerinin DNA Parmakizi Yöntemi ile Sınıflandırılması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 190 s.
- Özçağırın R., Ünal A., Özeker E. ve İsfendiyaroğlu M., 2011. *İlman İklim Meyve Türleri: Sert Çekirdekli Meyveler Cilt-I*. Ege Ü. Zir. Fak. Yay, No: 556, Bornova, İzmir.
- Sorensen, T. 1948. A method of Establishing Groups of Equal Amplitude in Plant Sociology Based on Similarity of Species Content and its Application to Analyses of the Vegetation on Danish Commons. *Vidensk Selsk Biol* 5: 1-34.
- Vos, P., Hogers, L., Bleeker, M., Van De Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot,J., Peleman, J., Kuiper, M. ve Zabeau, M., 1995. AFLP: A New Technique for DNA Fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.
- Wu X. ve Prior, R.L., 2005. Systematic Identification and Characterization of Anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in Common Foods in Theunited States: Fruits and Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 2589-2599.
- Xu D.H., Wahyuni, S., Sato, M., Yamaguchi, M., Tsunematsu, H ve Ban, T., 2006. Genetic Diversity and Relationship of Japanese peach (*Prunus persica* L) Cultivars Revealed by AFLP and Pedigree Tracing. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53:883-88.