

Ülkemizde Asma Fidanı Üretiminde Kullanılan Bazı Amerikan Asma Anaçlarının Moleküler Benzerlik Analizi

Ali ERGÜL¹

Y.Sabit AĞAOĞLU²

Geliş Tarihi:26.02.2001

Özet: Bu çalışmada ülkemizde asma fidanı üretiminde kullanılan üç Amerikan asma anacının (5BB, 110R, 140Ru), 4 farklı üretim istasyonundan (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Kalecik Bağcılık Araştırma İstasyonu, Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü, Manisa Bağcılık Araştırma Enstitüsü ve Sun Fidan A.Ş. (Salihli)) sağlanan örneklerde olası genetik farklılıklar RAPD tekniği ile araştırılmıştır.

Dört farklı damızlık parseline ait 5BB ve 110R örneklerinde herhangi bir polimorfize rastlanmaz ve anaçlara özgü bantlar elde edilirken, 140Ru anacında OPP17 (5' TGA CCC GCC T 3') primeri ile üç farklı genotipe (1.genotip: Tekirdağ-Kalecik, 2.genotip: Manisa, 3.genotip: Salihli) ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Amerikan asma anacı (5BB, 110R, 140Ru), RAPD, genetik farklılık/benzerlik

Molecular Similarity Analysis of Some Grapevine Rootstocks from Different Nursery in Turkey

Abstract: In this research, 5BB, 110R, 140Ru grapevine rootstocks obtained from different nursery (University of Ankara Faculty of Agriculture, Kalecik Viticultural Research Station, Tekirdağ Viticultural Research Institute, Manisa Viticultural Research Institute, Sun Fidan Co. (Salihli)) were analyzed by RAPD technique to determine probable genetic diversity.

Among samples of 5BB and 110R showed no polymorphism and gave unique band patterns for each rootstocks, while high polymorphism was reached 140Ru with OPP17 (5' TGA CCC GCC T 3') primer. Using this primer, there different genotypes (1st genotype: Tekirdağ-Kalecik, 2nd genotype: Manisa, 3rd genotype: Salihli) were determined in 140Ru rootstock.

Key Words: Grapevine rootstocks (5BB, 110R, 140Ru), RAPD, genetic diversity/similarity

Giriş

Asma fidanı üretiminde adına doğruluk büyük önem taşıırken, materyal temininde farklı kaynakların kullanımı genotipik farklılık riskini artırmaktadır. Ülkemizde asma fidanı üretiminin genel yapısı düşünülürse, üretim değişik kapasiteli kamu ve özel kuruluşlarca yapılmakta ve anaçlık çelikler işletmelerin bünyesindeki damızlık materyallerden sağlanmaktadır. Bu üretim yapısı ise ülkemizde üretilen asma fidanlarında anaç içi varyasyonların olabileceği fikrini uyandırmaktadır.

Bu çalışmada, ülkemizde fidan üretimi amacı ile kullanılan 4 farklı damızlık parselden sağlanan 5BB, 110R ve 140Ru anaçlarının olası farklılıkları RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) tekniği ile araştırılmıştır.

Ayrıca ülkemizde asma fidanı üretim kapasitesinin talebe uygun artırılmasına yönelik kullanılacak yeni parsellerin tesisinde doğru materyallerin belirlenmesi amacı ile DNA parmak izi tekniklerinin devreye girmesi gerekli görülmektedir. Dolayısıyla bu çalışma fidancılıkta tekniğin uygulanışı bakımından da öncü niteliği taşımaktadır.

Materyal ve Yöntem

Araştırmada bitkisel materyal olarak, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Kalecik Bağcılık Araştırma İstasyonu (Kalecik), Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü (Tekirdağ), Manisa Bağcılık Araştırma Enstitüsü (Manisa) ile Sun Fidan A.Ş. (Salihli)'den sağlanan 5BB, 110R ve 140Ru anaçlarına ait sürgün uçları kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan asma anaçlarının bazı özellikleri Çizelge 1'de verilmiştir (Howell 1987).

Araştırmanın metod aşamaları:

DNA izolasyonu: Anaçlara ait DNA izolasyonları Lodhi ve ark. (1994)'a ait yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

RAPD tekniği: DNA'lara ait bölgelerin çoğaltılması 25 µl toplam hacimde 90-120 ng DNA, 2,5 mM MgCl₂, 25 mM dNTP, 100 ng primer, 1x reaksiyon buffer'ı, 1 ünite Taq polimeraz (promega) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) programı ise; 94°C'de 30 sn (çift iplikçiğin ayrılması), 35°C'de 1 dk (primer-DNA eşleşmesi), 72°C'de 2 dk (yeni iplikçilik yazılım) 37 döngü ve 72°C'de 8 dk (son yazılım) şeklinde düzenlenmiştir.

¹ T.C. Tarım ve Köyşleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü-Ankara

² Ankara Üniv. Ziraat Fak. Bahçe Bitkileri Bölümü-Ankara

Çizelge 1. Araştırmada kullanılan asma anaçlarının bazı özellikleri

Anaç	Melezleme kombinasyonu	Filokseraya dayanıklılık	Kurağa dayanıklılık	Nematoda dayanıklılık	Aktif kirece dayanıklılık (%)
5BB	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i> .	Dayanıklı	Hassas	Dayanıklı	20
110R	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. rupestris</i>	Dayanıklı	Çok dayanıklı	Orta	17
140Ru	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. rupestris</i>	Dayanıklı	Çok dayanıklı	Dayanıklı	20

Çizelge 2. Araştırmada kullanılan primerler

Primer adı	Baz dizisi (5'-3')
OPA 1	CAG GCC CTT C
OPA 20	GTT GCG ATC C
OB03	CAT CCC CCT G
OPD 12	CAC CGT ATC C
OPP 17	TGA CCC GCC T

Primerler: RAPD analizi amacı ile değişik araştırmacılar tarafından *Vitis vinifera* L. ve Amerikan asma anaçları için önerilen polimorfiklik düzeyi yüksek 5 adet dekamer primer kullanılmıştır. (Ergül 2000, This ve ark.1997) (Çizelge 2).

Elektroforez koşulları: PCR sonucu, örnekler %1,5'lük agaroz jelde 2 saat süre ile 100 volt'da yürütülmüş ve bantlar etidyum bromid ile boyanarak polaroid 667 tip filmle görüntülenmiştir.

Bulgular ve Tartışma

PCR amplifikasyonu amacı ile test edilen 5 primerden OPP17 ve OPA1 oligonükleotidlerinde daha iyi sonuçlara ulaşılmıştır (Şekil 1).

Bunlardan OPP17 primeri 5BB, 110R ve 140Ru anaçlarını birbirinden ayırt ederken farklı üretim istasyonlarından sağlanan 140Ru anacında DNA düzeyinde varyasyonları ortaya çıkarmıştır. Anaçlar bazında bant polimorfikleri incelendiğinde; 4 istasyondan alınan 5BB anacına ait örnekler 5 bant (yaklaşık 700, 800, 1000, 1100 ve 1500 bp), 110R anacına ait örneklerde ise 3 spesifik RAPD bantı (yaklaşık 700, 800 ve 1700 bp) elde edilmiştir. 140 Ru anacında ise Kalecik ve Tekirdağ'dan alınan örneklerde 4 bant (yaklaşık 700, 800, 900 ve 1700 bp), Salihli'den alınan örneklerde 2 bant (yaklaşık 800 bp ve 1700 bp) ve Manisa'dan alınan örneklerde 3 banda

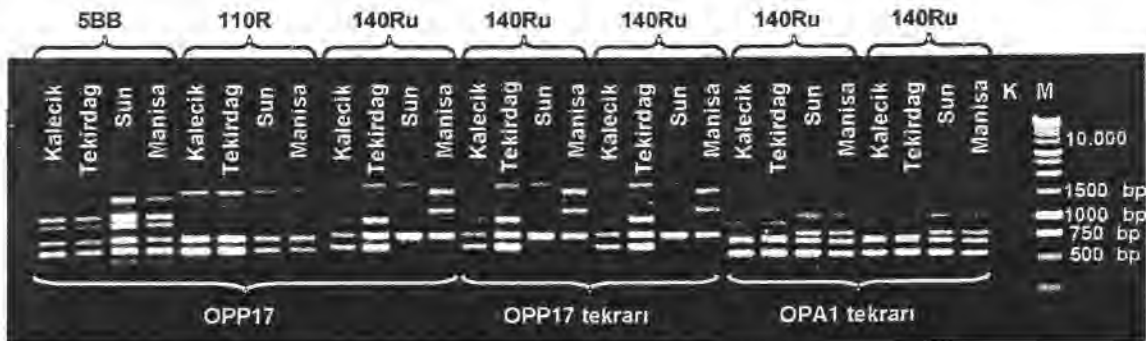
(yaklaşık 800, 1100 ve 1500 bp) ulaşılmıştır. Diğer taraftan 140Ru anacında OPA1 primeri ile yapılan analizlerde temel ayırım bantlarının yaklaşık 600-1000 bp büyüklüğünde ortaya çıktığı, bu bant sayılarının ise Kalecik ve Tekirdağ'dan alınan örneklerde 2 (yaklaşık 600 ve 750 bp), Manisa ve Salihli'den alınan örneklerde 3 (yaklaşık 600, 750 ve 800 bp) olduğu görülmüştür (Şekil 1).

Bu sonuçlara göre, ülkemizde anaç damızlık parselli olarak önem arz eden Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü, Manisa Bağcılık Araştırma Enstitüsü ve Sun Fidan A.Ş. ile daha lokal üretime yönelik Kalecik Bağcılık Araştırma İstasyonu'ndan sağlanan 5BB ve 110R anaçlarına ait çeliklerde farklı genotiplere rastlanmamış, anaçlar söz konusu merkezler itibari ile homojenlik göstermişlerdir.

140Ru anacında ise yapılan RAPD analizlerinde OPA 1 primeri ile 2, OPP17 primeri ile ise 3 farklı genotip ortaya çıkmıştır. Diğer bir ifade ile 140Ru anacında işletmeler itibari ile bir homojenliğe rastlanmamıştır. Bu anacın OPP17 primeri ile yalnızca Tekirdağ ve Kalecik örneklerinde benzer bant vermesi ise, Kalecik İstasyonu'na ait parsellerin Tekirdağ'dan sağlanan bitkisel materyallerle tesis edilmesinden kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla temel olarak üç farklı kaynaktan sağlanan 140Ru çelikleri farklı DNA profilleri vermiştir.

Söz konusu durum, ülkemizde asma fidanı üretiminde kullanılan bazı anaçlarda, işletmeler itibari ile farklılıkların bulunduğunu göstermektedir.

Araştırmadan ulaşılan sonuç olarak; ülkemizde asma fidanı üretiminde anaçlar bazında standart genotiplerin belirlenmesi, bunda ise DNA parmak izi tanılarının devreye sokulması önerilmektedir.



Şekil 1. OPP17-OPA 1 primerlerinin asma anaçlarında RAPD bant desenleri, K: kontrol, M: markör

Kaynaklar

- Ergül, A. 2000. Asmalarda (*Vitis vinifera* L.cvs.) Genomik DNA Parmak İzi Analizi İle Moleküler Karakterizasyon. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Basılmamış Doktora Tezi, 86s.
- Howell, G. S. 1987. *Vitis* Rootstocks. In: Rom, R.C. and Carlson, R.F. (eds). Rootstocks for Fruit Crops. s:451-473.
- Lodhi, M. A., G.-N. Ye, N. F. Weeden and B. I. Reisch, 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. Plant Mol. Biol. Repr., 12(1), 6-13.
- This, P., C. Cuisset and J. M. Boursiquot, 1997. Development of stable RAPD markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationships. Amer J. Enol. Vitic., 48(4), 492-501.

ANKARA ÜNİVERSİTESİ ZİRAAT FAKÜLTESİ TARIM BİLİMLERİ DERGİSİ YAYIN İLKELERİ

1. Dergide tarım bilimleri alanında yapılmış özgün araştırmalar yayınlanır.
2. Dergide yayınlanacak eserler Türkçe, İngilizce, Almanca ya da Fransızca dillerinden birinde yazılabilir.
3. Dergiye gelen eserin basımı öncesinde hakem görüşü alınır. Yayın komisyonuna gönderilen makalenin dergide yayınlanabilmesi için Yayın Kurulunca bilimsel içerik ve şekil bakımından uygun görülmesi ve hakemler tarafından kabul edilmesi gerekir. Yayınlanması uygun bulunmayan eser yazarına/yazarlarına geri gönderilir.
4. Dergide yayınlanacak eserin daha önce hiçbir yaygın organında yayınlanmamış ya da yayın hakkının verilmemiş olması gerekir.
5. Yayınlanması istenen eser dergiye, Microsoft Word Windows programında, Arial yazı karakterinde yazılarak, disketiyle birlikte, 1 bilgisayar çıktısı, 2 fotokopi olmak üzere toplam 3 nüsha gönderilir.
6. Dergide yayınlanan eserin yazarına/yazarlarına 5 (beş) adet ücretsiz ayrı baskı verilir.
7. Yazar soyadlarının son harfi üzerine rakam koyularak adresleri ilk sayfanın altında dipnot olarak verilir.
8. Yapılan çalışma bir kurum/kuruluş tarafından desteklenmiş ya da doktora/yüksek lisans tezinden hazırlanmış ise, bu durum ilk sayfanın altında dipnot olarak verilir.
9. Dergiye gönderilecek eser; Özet, Abstract, Giriş, Materyal ve Yöntem, Bulgular ve Tartışma, Sonuç, Teşekkür (gerekirse), Kaynaklar şeklinde düzenlenir.
10. Dergiye gönderilecek eser, A4 normunda birinci hamur kağıda, 170 x 250 mm'lik alanı kapsayacak şekilde ortada 0,5 cm boşluk bırakılarak 8,25 cm'lik iki sütun halinde hazırlanmalı ve 8 sayfayı geçmemelidir.
11. Eser hangi dilde yazılırsa yazılsın, Türkçe özet ve İngilizce abstract içermeli, özetlere aynı dilde başlık koyulmalı ve 200'er kelimeyi geçmemelidir. Özetler, 15 cm'lik tek sütun halinde 8 punto ve 1 aralık ile yazılmalıdır.
12. Metin, 9 punto ve 1 aralık ile yazılmalıdır. Şekil, grafik, fotoğraf ve benzerleri "Şekil", sayısal değerler ise "Çizelge" olarak belirtilir ve metin içine yerleştirilir. Şekil ve çizelgelerin eni 7,5 cm ya da 15,5 cm'yi geçmemelidir. Şekil, çizelge ve kaynaklar da kullanılan harf büyüklüğü 8 punto olmalıdır.
13. Eserde yararlanılan kaynaklara ilişkin yazım "yazar ve yıl" yöntemine göre yapılır. Üç ya da daha fazla yazarın kaynağı ifade edilmek istenirse "ve ark." kısaltması kullanılır, "Kaynaklar" bölümünde tüm yazarlar belirtilir.
14. Sözlü görüşmeler ve yayınlanmamış eserlere ait bildirimler, kaynak olarak kullanılmamalıdır.
15. Kaynaklar listesi ilk yazarın soyadına göre alfabetik olarak düzenlenir. Yararlanılan kaynak dergiden alınmışsa;
Yetişmeyen, A., N. Arıöz, 1995. Farklı koyulaştırma oranı ve kurulma sıcaklığında elde edilen yayıkaltı tozunun kalite kriterlerinin belirlenmesi. Gıda 20 (2): 117-122.
kitaptan alınmışsa;
Düzgüneş, O., T. Kesici, O. Kavuncu ve F. Gürbüz, 1987. Araştırma ve Deneme Metodları (İstatistik Metodları II). Ankara Üniv. Zir. Fak. Yay. No. 1021, 381 s., Ankara.
kitabın bir bölümünden alınmışsa;
Fıratlı, Ç. 1993. Arı Yetiştirme. "Ed. M. Ertuğrul. Hayvan Yetiştirme (Yetiştiricilik)", s. 239-270, Ankara.
anonim ise;
Anonim, 1993. Tarım İstatistikleri Özeti 1991. T.C. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü, Yayın No. 1579, Ankara.
internet ortamından alınmışsa;
<http://www.newscientist.com/ns/980228/features.html>
olarak verilmelidir.
16. Basımına karar verilen ve düzeltme için yazarına/yazarlarına gönderilen eserde, ekleme ya da çıkarma yapılamaz.
17. Yayın süreci tamamlanan eserler geliş tarihi esas alınarak yayınlanır.
18. Bir yazarın, aynı sayıda ilk isim olarak 1 (bir), ikinci ve diğer isim sırasında 1 (bir) olmak üzere toplam 2 (iki) eseri basılabilir.
19. Yayınlanan eserin tüm sorumluluğu yazar/yazarlarına aittir.