

Atıf İçin: Ersalı, Y., Özen, H. Ç., Tilkat, E. ve Onay, A. (2023). Mikro Çoğaltılan Dişi buttum (*Pistacia khinjuk* Stocks) Ağacında ISSR Belirteci ile Somaklonal Varyasyonun Belirlenmesi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(1), 600-608.

To Cite: Ersali, Y., Ozen, H. Ç., Tilkat, E., & Onay, A. (2023). Determination of Somaclonal Variation by ISSR Marker in Micropropagated Female Buttum (*Pistacia khinjuk* Stocks) Tree. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(1), 600-608.

Mikro Çoğaltılan Dişi buttum (*Pistacia khinjuk* Stocks) Ağacında ISSR Belirteci ile Somaklonal Varyasyonun Belirlenmesi

Yusuf ERSALI^{1*}, Hasan Çetin ÖZEN², Engin TİLKAT³, Ahmet ONAY²

Öne Çıkanlar:

- *Pistacia khinjuk* ağacında klonal mikroçoğaltım 1
- ISSR moleküler belirtecinin kullanılması²
- Somaklonal varyasyonun belirlenmesi 3

Anahtar Kelimeler:

- ISSR
- Polimorfizm
- Benzil Adenin
- Buttum

ÖZET:

Bitkilerde, biyotik ve abiyotik streslere karşı direnç istenenilen karakterler olup, mikroçoğaltım teknikleri ile elde edilen klonlarda bu genetik özelliklerin kaybolması istenmez. Mikroçoğaltım teknikleri ile klonlanmış bitkilerin genetik kararlılığını bilmek, ticari üretimde güvenli kullanımları hakkında önemli bir bilgi vermektedir. Bu çalışmada buttum (*Pistacia khinjuk* Stoks) dişi ağaçlarından (Ağaç1 ve Ağaç2) alınan sürgünler 5., 10., 15., 20. ve 24. alt kültürlerde anaç olarak kullanılmıştır. Donör bitkilerde (Ağaç 1 ve Ağaç 2) ve bunlardan alınan örneklerin rejenerasyon yoluyla elde edilen klonlarında somaklonal varyasyonun belirlenmesi için basit dizi tekrarı (ISSR) moleküler markörleri kullanılmıştır. Sürgün çoğaltması, 2 mg/L 6-benziladenin (BA) içeren Murashige ve Skoog (MS) ortamında sağlanmıştır. Sürgünler, 2 mg/L 1-Naftalinasetik asit (NAA) içeren MS ortamında köklendirilmiştir. Seçilen 20 adet primer kullanılarak 675'i polimorfik (%72) olmak üzere toplam 925 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı %36 (UBC841) ile %98 (UBC855) arasında değişmiştir. Benzerlik oranı, Ağaç 1 ile mikro-çoğaltılmış klonları arasında %74-79, Ağaç 2 ile mikro-çoğaltılmış klonları arasında %78-82 aralığında bulunmuştur.

Determination of Somaclonal Variation by ISSR Marker in Micropropagated Female Buttum (*Pistacia khinjuk* Stocks) Tree

Highlights:

- Clonal micropropagation of *Pistacia khinjuk* Tree1
- Use of ISSR molecular marker²
- Detection of somaclonal variation 3

Keywords:

- ISSR
- Polymorphism
- 6-benzyladenine
- *Pistacia khinjuk* Stocks

ABSTRACT:

The desired genetic characters that are resistant to biotic and abiotic stresses of rootstocks must be retained in clones obtained from micropropagation techniques without induction of somaclonal variations. Generally subculturing for long duration of times may end up in somaclonal variations. Knowing the genetic stability of micropropagated clone plants gives a clue about their safe use in commercial production. In this study, shoots taken from buttum (*Pistacia khinjuk* Stocks) female trees (Tree1 and Tree2), were used as rootstocks in 5th, 10th, 15th, 20th, and 24th subcultures. Inter-simple sequence repeat (ISSR) molecular markers were used for determination of somaclonal variation in the donor plants (Tree1 and Tree2) and its regenerated clones. Shoot proliferation was obtained on Murashige and Skoog (MS) medium containing 2.00 mg/L 6-benzyladenine (BA). The shoots were rooted on MS medium, containing 2 mg/L 1-Naphthaleneacetic acid (NAA). A total of 925 bands, 675 of which were polymorphic (72%), were generated using selected 20 primers. Polymorphism ratio ranged from 36% (UBC841) to 98% (UBC855). The similarity rate was found in range of 74-79% between Tree1 and its micropropagated clones, and 78- 82% between Tree2 and its micropropagated clones.

¹ Yusuf ERSALI (Orcid ID: 0000-0003-4848-5943), Batman Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Gıda İşletme Bölümü, Batman, Türkiye

² Hasan Çetin ÖZEN (Orcid ID: 0000-0001-6670-6469), Ahmet ONAY (Orcid ID: 0000-00002-7914-188X), Dicle Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Botanik Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye

³ Engin TLKAT (Orcid ID: 0000-0002-1654-7655), Batman Üniversitesi/Fen-Edebiyat Fakültesi/Biyoloji Bölümü/Botanik Anabilim Dalı/, Batman, Türkiye

***Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Yusuf ERSALI, e-mail: yusuferalian@gmail.com

GİRİŞ

Antep fıstığı (*Pistacia vera* L.) tohumları günlük diyetle işlenmiş veya işlenmemiş olarak tüketilebildiği için ticari değeri oldukça yüksektir. Antep fıstığı işlenmiş ürünleri, şekerlemede, fırınlanmış yiyeceklerde ve dondurmada kullanılır (Tous ve Ferguson, 1996). Antep fıstığının giderek artan değeri günümüzde yıllık bürüt değer cinsinden (2020-2021) 9 milyar dolara yaklaştığı bildirilmiştir (Shahbandeh, 2022). 2019/2020 üretim döneminde ABD’de 336 bin ton, İran’da 205 bin ton, Türkiye’de 85 bin ton, Suriye’de 70 bin ton ve Avrupa Birliği ülkelerinde 22 bin ton antep fıstığı üretilmiştir (Aslan, 2020). Antep fıstığı ülkemizde ihracat ve üretim hacmi ile önemli bir yer tutmaktadır. Bunun en önemli nedeni, ülkemizin antep fıstığının doğal yayılış alanı üzerinde olması ve ülkemizin ekolojik koşullarında daha iyi büyüyüp gelişmesidir. Kültür bitkilerinin büyüyüp gelişemediği veya yetiştiriciliğinin ticari olarak yapılamadığı susuz ve verimsiz, taşlı ve/veya kayalık eğimli topraklarda yetişen bir bitki olması, ülkemizdeki önemini giderek artırmaktadır. Antep fıstığının üretim kapasitesinin artırılması ekonomik açıdan büyük bir önem arz etmektedir. Yeni antep fıstığı bahçelerinin tesis edilmesi veya yabancı antep fıstığı anaçlarının aşılama ile üretim kapasitesinin artırılması mümkün hale gelecektir (Kuru ve Özşabuncuoğlu, 1990).

Ülkemizde *P. vera*, *Pistacia terebinthus* L., *Pistacia atlantica* Desf. ve *P. khinjuk* (buttum) başlıca kullanılan antep fıstığı anaçlarıdır (Ayfer ve ark., 1990). *P. khinjuk* aynı yaştaki diğer anaçlara göre özellikle aşılama bölgesi daha uygun kalınlıkta olduğundan aşılama işleminde avantajlar sağlamaktadır. *P. khinjuk* aşılama açısından uygun kalınlıkta düz gövdeler oluştururken, *P. vera* ve *P. atlantica* uzun gövdeler oluşturduğu halde gövdenin kalınlığı fazla gelişmemektedir (Tekin ve ark., 2001). Türkiye’de buttum anacının avantajı, su stresine karşı dayanıklılığı, kök uru nematodlarına gösterdiği dayanma gücü, zayıf topraklarda iyi büyüyüp gelişmesi gibi kendine özgü özelliklere sahip olmasıdır (Tekin ve ark., 2001). Türkiye’de kullanılan kültür çeşitleriyle aşılama sonrası aşı sürgünlerinin gelişmesi yüksektir ve uyum sorunu yaşanmamaktadır (Ayfer ve ark., 1990). *P. vera*, *P. khinjuk* ve *P. atlantica* anaçları, Uzun, Kırmızı, Halebi, Siirt, Ohadi ve Kellekoçi kültür çeşitleri ile aşılama ile elde edilen meyve salkımında meyve sayısının *P. khinjuk* anacında en yüksek, *P. vera* anacında en düşük olduğu tespit edilmiştir. Meyvelerde çıtlayan meyve sayısı yüzdesi açısından da *P. khinjuk* %3.1 ile en fazla çıtılma oranına sahip iken en düşük çıtılma yüzdesinin %0.9 ile *P. atlantica* anacında olduğu ve *P. vera* anacında bu oranın %1.4 olduğu tespit edilmiştir (Atlı ve ark., 2014).

Geleneksel olarak antep fıstığı anaçları tohum ile çoğaltılmaktadır ancak, tohumlarda çimlenme yüzdesi çok düşüktür ve bu durumun üreticiler için hala önemli bir sorun olarak devam ettiği bildirilmiştir (Ayfer ve Serr, 1961; Joley, 1960; Joley ve Opatiz, 1971). Çelikle çoğaltma diğer ağaç türleri ile karşılaştırıldığında nispeten zor olduğu bildirilmiştir (Serdar ve Fulbright, 2019). *Pistacia* türleri heterozigoti gösterdiğinden varyasyonlara açıktır oysa ürün kalitesinin değişmemesi üreticiler açısından istenen özelliktir. Bu sorun biyoteknolojik bir yöntem olan klonal-mikroçoğaltım yöntemiyle aşılmaya çalışılmış ve varyasyon içermeyen uniform antep fıstığı anaçları elde edilmiştir. Birçok antep fıstığı anacı bilimsel araştırmalar amacı ile mikçoğaltılmış ise de ticari olarak sadece melez (*P. atlantica* x *P. integerrima*) UCB1 anacı mikçoğaltılmıştır (Serdar ve Fulbright, 2019).

Somaklonal varyasyon doku kültüründe bulunan hücrelerde meydana gelen değişiklikler olarak ifade edilmektedir (Larkin ve Scowcroft, 1981). Bu tür değişiklikler in vitro büyüme gelişme ortamlarında meydana gelebilmekte ve hücredeki sürekli devam eden değişiklikler (genetik değişim) ya da hücredeki sürekli devam etmeyen değişiklikler (epigenetik değişim) olarak tanımlanmaktadır (Orbovic ve ark., 2008). Sürekli devam eden değişiklikler, DNA sekansının kalıcı olarak değişmesi nedeniyle görülen kalıtsal değişimlerdir. Bu değişimlerin mutasyona sebep olduğu kabul edilmektedir

(Larkin ve Scowcroft, 1981). Sürekli devam etmeyen değişiklikler, hücrelerin büyüme ve gelişme ortamındaki fizyolojik nedenlerden dolayı ortaya çıkan büyüme ve gelişme koşulları değiştiğinde değişen geçici değişikliklerdir (Kaepler ve ark., 2000). Kalıtsal değişikliklere eksplantın genetik özellikleri ve tipi (Gaj, 2004), kültürde kalma süresi (Smýkml ve ark., 2007) ve besin ortamı komponentleri neden olabilmektedir (Pierik, 1987). Klonal-mikroçoğaltımda amaç aynı genetik yapıda bitkiler üretmektir ancak bazı uygulamalarda kontrol edilemeyen çeşitlilikler ortaya çıkabilmektedir.

Bu çalışmada Ağaç1 ve Ağaç2 genotiplerinden in vitro kültürler başlatılmıştır. Ağaç1 ve Ağaç2 genotiplerinin 5., 10., 15., 20., 24. alt kültürlerinden elde edilen klonlarda somaklonal varyasyon miktarı Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm (Inter Simple Sequence Repeat/ISSR) tekniği ile tespit edilmeye çalışılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bitkisel Materyal

Donör bitki materyali, Gaziantep Fıstık Araştırma İstasyonu bahçesinde bulunan iki adet dişi buttum ağacı (Ağaç1, Ağaç2) donör stoğu olarak kullanılmıştır. İn vitro koşullarda kültür başladıktan sonra bu kültürlerden elde edilen aksenik sürgün uçları alt kültürlenerek sürgün stokları elde edilmiştir. Sürgün çoğaltımı 30 g/L sukroz ve 6 g/L agar ile 2 mg/L benzil adenin (BA), B5 vitaminleri Gamborg ve ark. (1968), 100 mg/L inositol, içeren Murshige ve Skoog (1962) besin ortamı, Köklendirme ortamı 2mg/L naftalen asetik asit (NAA) ile desteklenmiştir. Kültürler 16 saat floresan ışık (36 µmol m⁻² s⁻¹) foto periyodunda %90 nemli bir ortamda GA 7 kapalı kültür kaplarında bekletilmiştir. Ağaç1 ve Ağaç2'den alınan yaprak örnekleri ve Ağaç1 ve Ağaç2'nin mikroçoğaltılmış 5., 10., 15., 20., 24. alt kültür klonlarının yaprak örnekleri alınarak alüminyum folyoya sarılıp -20 °C de bekletilmiştir.

Genomik DNA Ekstraksiyonu

Genomik DNA izolasyonu ve DNA ekstraksiyonu için antep fıstığında kullanılan Doyle ve Doyle (1987)'nin geliştirdiği ve Kafkas ve ark. (2001) tarafından modifiye edilen yöntem kullanılmıştır. Çalışmada ana materyaller ve klonlara ait genomik DNA'ların taranmasında 20 ISSR primeri kullanılmıştır (Çizelge 1.).

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan ISSR primerlerinin dizileri ve bağlanma sıcaklıkları

No	Primer Adı	Primer Dizisi (5' – 3')	Primer Bağlanma Sıcaklığı
1	3ASSR27	(CT) ₇ GAG	51 °C
2	3ASSR53	(AG) ₈ CA	51 °C
3	CHR	(CA) ₇ YG	51 °C
4	UBC 830	(TG) ₈ G	51 °C
5	UBC 847	(CA) ₈ RC	51 °C
6	UBC 859	(TG) ₈ RC	51 °C
7	ISSR 15	(CA) ₈ RC	53 °C
8	ISSR 8	(GA) ₈ YG	53 °C
9	UBC 811	(GA) ₈ C	53 °C
10	UBC 835	(AG) ₈ YC	53 °C
11	UBC 855	(AC) ₈ YT	53 °C
12	W 814	(CT) ₈ TG	53 °C
13	3ASSR42	(GACA) ₄ C	54 °C
14	3ASSR55	(AG) ₈ TG	54 °C
15	ISSR 18	(GT) ₈ YA	54 °C
16	ISSR 4	(AG) ₈ RT	54 °C
17	ISSR 9	(GT) ₈ RA	54 °C
18	UBC 825	(AC) ₈ T	54 °C
19	UBC 841	(GA) ₈ YC	54 °C
20	UBC 857	(AC) ₈ YG	54 °C

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) karışımı (1X Taq Buffer, 4 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.8 nmol primer, 0.5 U/μl Taq polimeraz) ayrıca, genomik DNA örnekleri (Çizelge 2.), PZR’de kullanılmak üzere 1 ng/μl olacak şekilde sulandırılmıştır. Sonra başlangıç denatürasyon sıcaklığı 94 °C’de 3 dakika 94 °C’de 1 dakika, primerin bağlanması 51-54 °C’de 1 dakika, zincir uzaması 72 °C’de 1 dakika ve son uzama 72 °C’de 10 dakika olacak şekilde PZR koşulları ayarlanarak PZR uygulanmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrezinde Görüntülenmesi

PZR ürünleri, % 1.5’lik agaroz jelde incelendi. DNA’nın görüntülenebilmesi için floresan özellik gösteren boyar madde kullanılmıştır. PZR ürünleri Red Safe Nucleic Acid Staining Solution (20,000x) boyama maddesi ile karıştırıldıktan sonra agaroz jele yüklenmiştir. PZR ürünlerinin miktarını belirlemek için GeneRuler™ 100 bp, 50 bp DNA Ladder (Fermentas) kullanılmıştır. Jel, 200 Volta 60 dakika yürütüldükten sonra jel görüntüleme cihazı [MiniBIS Pro Visualizing System (DNr Bio-Imaging Systems)] ile ultra viyole ışık altında görüntülenmiştir.

Çizelge 2. Agaroz jel elektrofrezinde kullanılan çözeltiler

TBE Tamponu (10X)	Trisma Baz	890 mM
	EDTA	20 mM
	Borik Asit	890 mM
Yükleme Boyası (6X)	Bromofenol mavisi	%0.25 (w/v)
	Sukroz	%40 (w/v)
Red Safe	Red Safe Nükleik asit işaretleme çözeltisi	20.000x

Oluşan Bantların Değerlendirilmesi, Benzerlik Oranlarının Hesaplanması ve Dendogramların Oluşturulması

PZR ürünlerinin jel görüntülerinden elde edilen bantlar “**GenoSoft 3.8.2**” software programında analiz edilmiştir. Elde edilen veri matrisi, “**Popgen32**” programı ile genetik benzerlik ve genetik uzaklık ölçümü yapılmıştır (Nei, 1978). Bu matrikse dayalı oluşan dendogram, “**TreeView**” programı ile görüntülenmiştir.

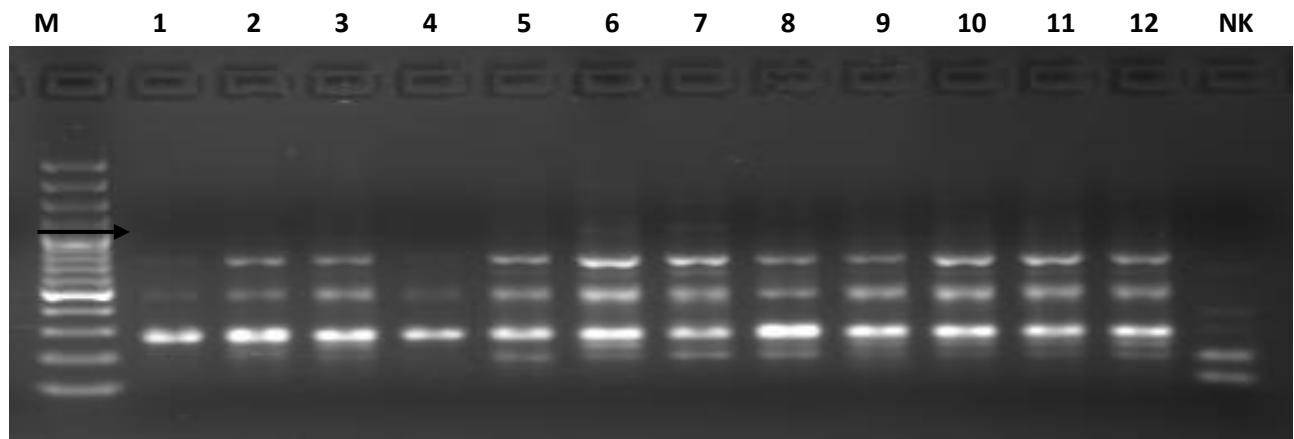
BULGULAR VE TARTIŞMA

Dişi buttum ağacına ait donör bitkiler (Ağaç1, Ağaç2) ve mikroçoğaltılan klonlarına ait genomik DNA’larda kullanılan 20 adet ISSR primerine ait skorlanabilir PZR ürünleri ve polimorfizm oranları incelendiğinde; kullanılan primerlerin 173-2097 baz çifti aralığında bant ürettiği görülmüştür. En çok bant oluşturan primerin 64 bant ile UBC857 primeri olduğu görülmektedir. Bu 64 bantın 61 tanesi polimorfik bant olmuş ve polimorfizm oranı %95.3 olarak hesaplanmıştır. En az bant oluşturan primerin 33 bant ile UBC859 primeri olduğu ortaya konmuştur (Çizelge 3.). Bu 33 bantın 23 tanesi polimorfik bant olmuş ve polimorfizm oranının %69.6 olduğu belirlenmiştir. En yüksek polimorfizm oranı UBC855 primerinde %98.1 en düşük polimorfizm oranının ise %36.8 ile UBC841primerinde olduğu tespit edilmiştir. 20 adet ISSR primerinin oluşturduğu toplam 925 bantın 675 tanesi polimorfik bant olmuş ve polimorfizm oranı %72.9 olarak tespit edilmiştir. İki farklı primere (UBC859 ve 3ASSR27) ait jel görüntüleri sırasıyla Şekil 1 ve Şekil 2’de verilmiştir.

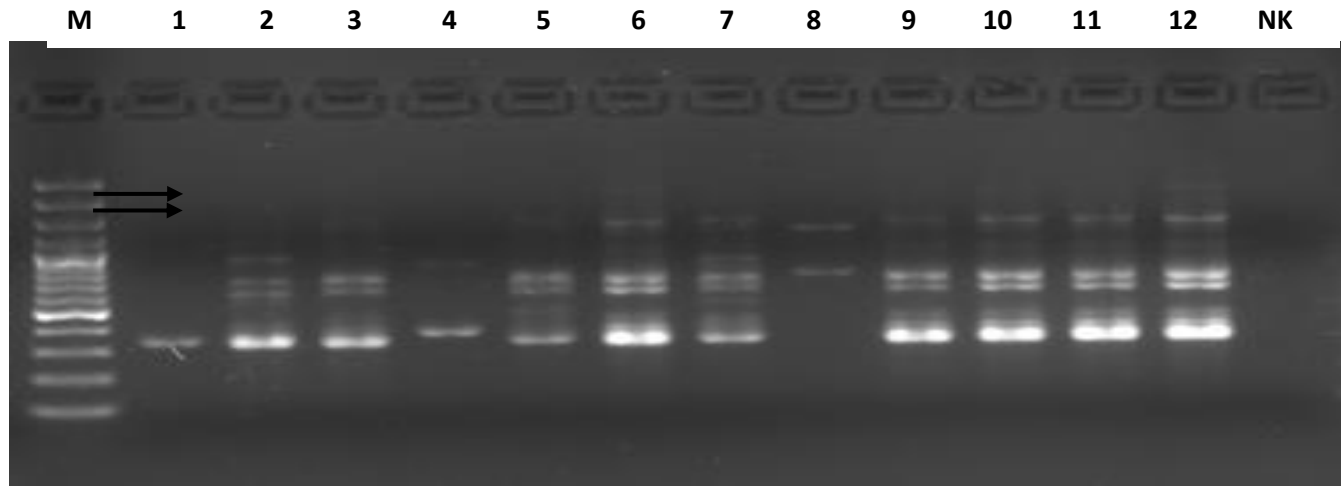
PZR amplifikasyonu sonucu Ağaç1 ve Ağaç2 ile mikroçoğaltılan klonları arasında (Nei, 1978) katsayılarına göre oluşturulan benzerlik matrisi (Çizelge 4.) ve dendogram (Şekil 3.) sonuçlarına bakıldığında; genel olarak altkültürleme sayısı artıka klonların donör (Ağaç1 ve Ağaç2) bitkilerden genetik olarak uzaklaştığı görülmektedir. Mikroçoğaltım teknikleri kullanılarak elde edilen bitkilerde, genetik farklılığın nedeni, mikroçoğaltım metodu, bitkinin genetiği, kültür başlangıç eksplantı tipi,

bitki büyüme düzenleyicilerinin tipi ve miktarı, *in vitro* kültür süresi olarak kabul edilmektedir (Pierik, 1987). Meyve veren otsu ya da odunsu bitkilerin ticari olarak mikroçoğaltımı yapılabilmektedir (Noormohammadi ve ark., 2014). Ancak *in vitro* çoğaltım tekniği, donör bitki ile mikroçoğaltılan klonları arasında genetik farklılığın ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (Larkin ve Scowcroft, 1981). Mikroçoğaltım tekniği ile elde edilen klonların donör bitkiye genetik olarak yakınlığının yüksek olması önem arz eden bir ölçüt olarak değerlendirilmektedir (Noormohammadi ve ark., 2014). Soma klonal varyasyonlar *in vitro* koşullarında kendiliğinden ortaya çıkmaktadır. Bu varyasyonlar hücredeki kalıcı (genetik) değişiklikler ya da hücre ve dokulardaki genetik olmayan değişiklikler olarak kabul edilmektedir (Orbovic ve ark., 2008).

Literatürde çeşitli bitki türlerinde PZR temelli farklı moleküler belirteçler kullanılarak *in vitro* mikroçoğaltım tekniklerinde somaklonal varyasyonun yüksek ya da düşük seviyelerde olduğunu bildiren farklı sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin; 4 ve 6 yıl boyunca sürgünler kullanılarak mikroçoğaltılan badem (*Prunus dulcis* [Mill.] D. A. Webb.) bitkisinin genetik kararlılığı için yapılan çalışmada RAPD ve ISSR belirteçleri kullanılmış ve mikro çoğaltılabilir düzeyde varyasyonların elde edildiği ortaya konmuştur (Martins ve ark., 2004). Benzer şekilde 8 yıl boyunca mikroçoğaltılan Londra çınarı (*Platanus acerifolia* Willd.) bitkisinde 38 adet farklı ISSR primeri kullanılarak test edilen somaklonal varyasyon çalışmasında genetik benzerliğin %92-100 arasında olduğu vurgulanmıştır (Huang ve ark., 2009). Elma (*Malus pumila* Mill.) anacında yapılan genetik kararlılık çalışmasında 10 adet RAPD primeri kullanılmış ve Jaccard'ın benzerlik matrisine göre ana bitki ile klonları arasında % 93-100 arasında benzerlik olduğu vurgulanmıştır (Gupta ve ark., 2009). Başka bir çalışmada 5 ve 7 yıl boyunca alt kültürü yapılmış antep fıstığı (*Pistacia vera* L.) bitkisinin RAPD, AFLP ve ISSR moleküler teknikleri kullanılarak yapılan çalışmada ana bitkiler ile klon bitkiler arasında kabul edilebilir bir varyasyonun olduğu tespit edilmiştir (Akdemir ve ark., 2016). Antep fıstığı melez anaçlarında 12 aylık alt kültürleme sonucu elde edilen klonlara uygulanan ISSR ve IRAP teknikleri makul düzeyde bir polimorfizmin olduğunu ve melez *Pistacia* anaçlarının klonal mikroçoğaltımı için geliştirilen mikçoğaltım metodunun güvenilir bir şekilde kullanılabileceği vurgulanmıştır (Çalar, 2018). Diğer taraftan, Dağ kahvesi (*Coffea arabica* L.) bitkisinde mtRFLP, RAPD ve ISSR primerleri (Rani ve ark., 2000), tespih ağacı (*Melia azedarach* L. var. *umbraculifera* Knox) bitkisinde RAPD primerleri (Olmos ve ark., 2002), *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. f., bitkisinde RAPD ve ISSR primerleri (Guo ve ark., 2006) kullanılarak yapılan somaklonal varyasyon çalışmalarında DNA dizi seviyesinde genetik değişkenlik içerdiği gösterilmiştir.



Şekil 1. UBC859 primeri ile dişi buttum ağacı örnekleri PZR ürünü agaroz jel görüntüsü; M:100 bp DNA ladder, 1: Ağaç1, 2: Ağaç2, 3: Ağaç1-5. alt kültür, 4: Ağaç1-10. alt kültür, 5: Ağaç1-15. alt kültür, 6: Ağaç1-20. alt kültür, 7: Ağaç1-24. alt kültür, 8: Ağaç2-5. alt kültür, 9: Ağaç2-10. alt kültür, 10: Ağaç2-15. alt kültür, 11: Ağaç2-20. alt kültür, 12: Ağaç2-24. alt kültür. NK:Negatif Kontrol. Oklar polimorfik bantları temsil etmektedir.

Mikro Çoğaltılan Dişi buttum (*Pistacia khinjuk* Stocks) Ağacında ISSR Belirteci ile Somaklonal Varyasyonun Belirlenmesi

Şekil 2. 3ASSR27 primeri ile dişi buttum ağacı örnekleri PZR ürünü agaroz jel görüntüsü; M:100 bp DNA ladder, 1: Ağaç1, 2: Ağaç2, 3: Ağaç1-5. alt kültür, 4: Ağaç1-10. alt kültür, 5: Ağaç1-15. alt kültür, 6: Ağaç1-20. alt kültür, 7: Ağaç1-24. alt kültür, 8: Ağaç2-5. alt kültür, 9: Ağaç2-10. alt kültür, 10: Ağaç2-15. alt kültür, 11: Ağaç2-20. alt kültür, 12: Ağaç2-24. alt kültür. NK:Negatif Kontrol. Oklar polimorfik bantları temsil etmektedir.

Çalışmamızda kullandığımız ISSR tekniği ve primerlerin Polimorfizm Bilgi İçeriği (Polymorphism Information Content/PIC) güvenilirliği Botstein ve ark. (1980)'e göre güvenilir olarak çıkmıştır. Nei (1978) kuralına göre Benzerlik oranı Ağaç1 ile klonu arasında en düşük %74 en yüksek %79, Ağaç2 ve klonu arasında en düşük %78 en yüksek %82 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 3. Kullanılan primerlerin ürettiği bantlar ve polimorfizm

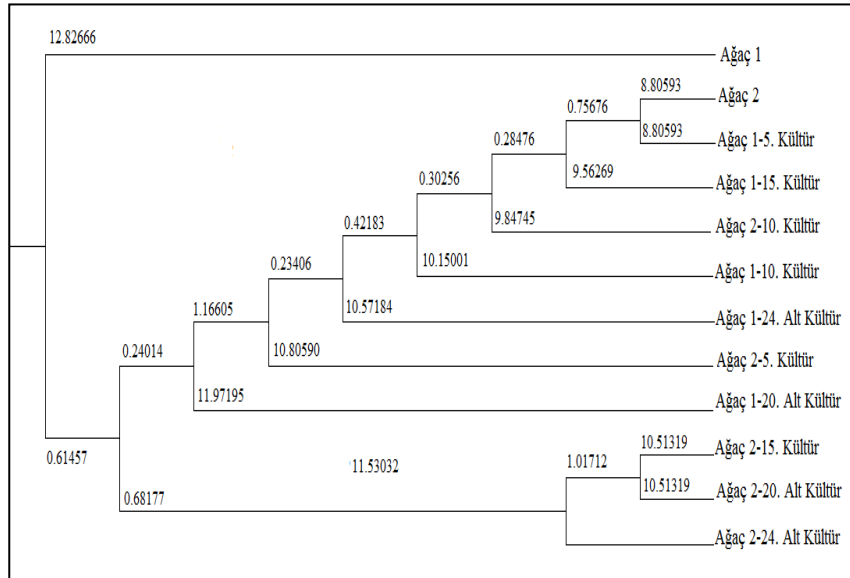
Primer İsmi	Primer Dizisi (5' – 3')	Bant Uzunluğu (bp)	Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	Polimorfizm (%)	PIC Değeri (ort.)
3ASSR27	(CT) ₇ GAG	319-1763	34	31	91.176	0.96539
3ASSR53	(AG) ₈ CA	372-1511	58	51	87.931	0.97859
CHR	(CA) ₇ YG	425-1263	47	23	48.936	0.94431
UBC 830	(TG) ₈ G	220-1285	46	28	60.869	0.95368
UBC 847	(CA) ₈ RC	242-839	40	26	65.000	0.94370
UBC 859	(TG) ₈ RC	306-884	33	23	69.696	0.93480
ISSR 15	(CA) ₈ RC	231-874	37	20	54.054	0.89408
ISSR 8	(GA) ₈ YG	188-1965	37	36	97.297	0.97151
UBC 811	(GA) ₈ C	318-1143	46	29	63.043	0.95652
UBC 835	(AG) ₈ YC	238-1200	44	34	77.272	0.96590
UBC 855	(AC) ₈ YT	266-1532	53	52	98.113	0.98042
W 814	(CT) ₈ TG	323-1697	34	22	64.705	0.91176
3ASSR42	(GACA) ₄ C	266-1629	36	25	69.444	0.94907
3ASSR55	(AG) ₈ TG	303-1149	44	42	95.454	0.97520
ISSR 18	(GT) ₈ YA	343-1212	44	28	63.636	0.95351
ISSR 4	(AG) ₈ RT	173-1107	59	40	67.796	0.96294
ISSR 9	(GT) ₈ RA	274-1367	53	28	52.830	0.95336
UBC 825	(AC) ₈ T	328-1480	59	55	93.220	0.98075
UBC 841	(GA) ₈ YC	187-1105	57	21	36.842	0.91535
UBC 857	(AC) ₈ YG	255-2097	64	61	95.312	0.98291
Toplam			925	675	72.972	0.95369

Mikro Çoğaltılan Dişi buttum (*Pistacia khinjuk* Stocks) Ağacında ISSR Belirteci ile Somaklona Varyasyonun Belirlenmesi

Çizelge 4. Dişi buttum ağacına ait donör bitkiler (Ağaç1, Ağaç2) ve mikroçoğaltılan klonlarında Nei (1978) kuralına göre genetik benzerlik matrisi

pop ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	***	0.795	0.785	0.782	0.783	0.748	0.774	0.782	0.785	0.765	0.754	0.755
2		***	0.838	0.817	0.828	0.792	0.807	0.805	0.820	0.795	0.783	0.782
3			***	0.822	0.823	0.791	0.808	0.804	0.819	0.785	0.773	0.774
4				***	0.817	0.779	0.794	0.792	0.807	0.779	0.770	0.774
5					***	0.780	0.825	0.803	0.823	0.783	0.774	0.776
6						***	0.789	0.782	0.794	0.786	0.751	0.749
7							***	0.808	0.811	0.795	0.792	0.770
8								***	0.819	0.800	0.791	0.783
9									***	0.817	0.814	0.795
10										***	0.810	0.800
11											***	0.788
12												***

1: Ağaç1, 2: Ağaç2, 3: Ağaç1-5. alt kültür, 4: Ağaç1-10. alt kültür, 5: Ağaç1-15. alt kültür, 6: Ağaç1-20. alt kültür, 7: Ağaç1-24. alt kültür, 8: Ağaç2-5. alt kültür, 9: Ağaç2-10. alt kültür, 10: Ağaç2-15. alt kültür, 11: Ağaç2-20. alt kültür, 12: Ağaç2-24. alt kültür



Şekil 3. Dişi buttum ağacına ait ana bitkiler (Ağaç1, Ağaç2) ve mikroçoğaltılan klonlarında TreeView programı ile oluşturulan dendrogram

SONUÇ

ISSR belirteci primerleri PZR ürünlerinde buttum bitkisi donör ve klon genomları arasında güvenilirliği yüksek polimorfik bantlar oluşmuştur. Donör bitki ve klonlar arasında benzerliklerin bu primerler kullanılarak tespit edilebileceği görülmüştür. ISSR belirteç sistemi ve kullanıla 20 adet primer ile buttum dişi ağacından mikroçoğaltılan klonları arasında alt kültür sayısı artıka somaklona varyasyon derecesinin artığı tespit edilmiştir. *Pistacia* cinsinin önceki çalışmaları ile benzer bir fiziksel ve kimyasal ortamda büyütülen klonlarda düşük genetik kararlılığın görülmesi başka moleküler belirteçlerle desteklenmesini gerekli kılmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmaya, Batman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü “BTÜBAP-2011-FED-1” kodlu proje numarası ile destek sağlanmıştır.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Akdemir, H., Suzerer, V., Tilkat, E., Onay, A. ve Özden-Çiftçi, Y. (2016). Detection of variation in long-term micropropagated mature pistachio via dna-based molecular markers. *Appl Biochem Biotechnol*, 180: 1301–1312
- Aslan, N. (2020). Antep fıstığı İstatistikleri. *Antep Fıstığı Araştırma Dergisi*, 2-5.
- Atlı, H.S., Bozkurt, H. Ve Sarpkaya, (2014). Antepfıstığı anaçlarının antepfıstığı çeşitlerinin erken çitlmasına etkisi. *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi*, 7 (1): 30-36.
- Ayfer, M. ve Serr, E. F. (1961). Effect of gibberellin and other factors and seed germination and early growth in pistachio species. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 77: 308-315.
- Ayfer, M., Okay, Y. ve Erdogan, V. (1990). Antepfıstığı anaçları ve çoğaltılmaları. Türkiye 1. Antepfıstığı Sempozyumu Bildirileri, 11-12 Eylül 1990- Gaziantep, Pp. 38-48.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., ve Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal Of Human Genetics*, 32(3), 314–331.
- Çalar N, 2018. *Melez Pistacia genotiplerinin klonal mikroçoğaltımı ve IRAP-ISSR moleküler belirteçleri ile genetik kararlılıklarının belirlenmesi*. (Doktora tezi). Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi>
- Doyle, J. J. ve Doyle, J.L. (1987). A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
- Gaj, M. D. (2004). Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.). *Heynh. Plant Growth Regul.*, 43:27–47.
- Guo, W. L., Gong, L., Ding, Z. F., Li, Y. D., Li, F. X., Zhao, S. P. ve Liu, B. (2006). Genomic instability in phenotypically normal regenerants of medicinal plant *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. F., as revealed by ISSR and RAPD markers. *Plant Cell Reports*, 25: 896–906.
- Gupta, R., Modgil, M., ve Chakrabarti, S. K. (2009). Assessment of genetic fidelity of micropropagated apple rootstock plants, EMLA 111, using RAPD markers. *Indian Journal Of Experimental Biology*, 47(11): 925–928.
- Huang, W. J., Ning, G. G. ve Liu, G. F. (2009). Determination of genetic stability of long-term micropropagated plantlets of *Platanus acerifolia* using ISSR markers. *Biol Plant* 53: 159–163.
- Joley, L. E. (1960). Experiences with propagation of the genus *Pistacia*. *Proc. Intl. Plant Prop. Soc.* 10: 287-292.
- Joley, L. E. ve Opitz, K. W. (1971). Further experience with propagation of *Pistacia*. *Comb. Proc. Intl., Plant Prop. Soc.* 21:67-76.
- Kaeppeler, S. M., Kaeppeler, H. F. ve Rhee, Y. (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology*, 43:179-188.
- Kafkas, S., Perl-Treves, R. (2001). Morphological and molecular phylogeny of *Pistacia* species in Turkey. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 908-915.
- Kuru, C. ve Özşabuncuoğlu, İ. H. (1990). Yabancı *Pistacia* Türlerinin Aşılmasında sorunla ve çözüm yolları, Türkiye Birinci Antep Fıstığı Sempozyumu Kitabı syf. 49.

- Larkin, P. J. ve Scowcroft, W. R. (1981). Somaclonal variation: a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor Appl Genet*, 60:197–214.
- Martins, M., Sarmiento, D. ve Oliveira, M. M. (2004). Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Reports*, 23(7): 492–496.
- Murashige, T. ve Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals, *Genetics*, 89: 583-590.
- Noormohammadi, Z., Foroutan, M., Sheidai, M. ve Alishah, O. (2014). Chromosome pairing and genome size analysis in F1 and F2 offspring derived from crossing *Gossypium barbadense* and *G. hirsutum*. *Gene Conserve*, (52):14-26.
- Olmos, S. E., Lavia, G., Di, Renzo, M., Mroginski, L. ve Echenique, V. (2002). Genetic analysis of variation in micropropagated plants of *Melia azedarach* L. *In Vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 38(6): 617–622.
- Orbovic, V., Calovic, M., Vilorio, Z., Nielsen, B., Gmitter, F., Castle, W. ve Grosser, J. (2008). Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. *Euphytica*, 161: 329-335.
- Pierik, R. L. M. (1987). In vitro culture of higher plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holland.
- Rani, V., Singh, K. P., Shiran, B., Goel, S. N. S., Devarumath, R. M., Sreenath, H. L. ve Raina, S. N. (2000). Evidence for new nuclear and mitochondrial genome organizations among high-frequency somatic embryogenesis-derived plants of allotetraploid *Coffea arabica* L. (Rubiaceae). *Plant Cell Reports*, 19: 1013–1020.
- Serdar, Ü., & Fulbright, D. (2019). Achieving sustainable cultivation of tree nuts. *Tree Nuts* (pp. 174-180). Burleigh Dodds Science Publishing.
- Shahbandeh, M. (2022). Pistachio market worldwide and in the U.S. - statistics & facts. URL:<https://www.statista.com/topics/5158/pistachio-market/#dossierKeyfigures>
- Smýkml, P., Valledor, L., Rodríguez, R., Griga, M. (2007). Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term in vitro shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Rep*, 26:1985–1998.
- Tekin, H., Arpacı, S., Atli, S., Açar, İ., Karadağ, S., Yükçeken, Y. ve Yaman, A. (2001). Antepfıstığı yetiştiriciliği kitabı. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, S. 9-38. Ankara.
- Tous, J., & Ferguson, L. (1996). Mediterranean Fruits, (pp 416-430). In: Janick, J. (Ed.), Progress in new crops, Ar- lington.