



AHUDUDU (Rubus idaeus L.) BİTKİSİNDEKİ BİYOTEKNOLOJİK ÇALIŞMALAR

Bilal KAZAN**

**** Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Isparta TÜRKİYE**

bilal.kazanbk1@gmail.com

ÖZET

Bir üzümstü meyve türü olan ahududu, Rocaceae familyasının Rubus cinsi içerisinde yer alır. Rubus cinsi, çok sayıda oldukça heterojen yapıya sahip türleri içerir. Ahududu, dünyada geniş bir yayılım alanına sahiptir. Karadeniz bölgesi, ahududunun anavatanı sınırları içerisinde yer almaktadır. Türkiye'nin kuzeyinde, batıdan doğuya uzanan bir kuşak boyunca, genellikle 1000 m ve daha fazla yüksekliklerde, hava nemi fazla olan yerlerde doğal olarak yetişmektedir. Kırmızı ahududu "Florican" ve "Primocane" çeşitleri olmak üzere iki tipe ayrılırlar. Florican çeşitler ile yıl içerisinde iki kez ürün alınabilirken, Primocane çeşitler ile yıl içerisinde bir kez ürün alınabilmektedir. Ahududu kendine özgü cezbedici renk, tat, aroması, yapı ve kokusu ile taze tüketim yanında gıda, endüstri, farmakoloji gibi çok çeşitli kullanım alanları bulması sebebiyle diğer meyveler arasında çok özel bir yere sahiptirler. Ayrıca ahududu bünyesinde bulundurduğu bazı pigmentler, fenoller, flavonlar, flavonoidler ve vitaminlerin miktarları bakımından diğer meyve türlerinden çok yüksek olduğu bildirilmiştir. Dünya ahududu üretimi ilk sırayı Rusya alırken sırayı, Polonya, ABD, Sırbistan ve Meksika takip etmektedir. Ülkemizde ise 2015 yılında ahududu üretimi 4320 ton olmuştur. Ülkemizde birim alana verimin düşük olması, yıllardan beri ahududu yetiştiriciliğinin amatör olarak yapılmasının yanı sıra yetiştiriciliği yaygın olan illerde düzenli kapama bahçelerinin bulunmaması ve kültürel işlemlerin gereği gibi yapılmamasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle ahududu meyvesinde üretimi ve birim alandaki verimi artırmak için çeşitli biyoteknolojik yöntemlere başvurulmaktadır. Bitki doku kültürü laboratuvarlarında in vitro koşullarda bitkinin büyümesi ve gelişmesi için kültür ortamı, ışık ve sıcaklık gerekli düzeyde ayarlanabilmekte ve optimum şartlar temin edilebilmektedir. Sonuç olarak ahududunun hastalıklar ve çevresel stres faktörlerinin olumsuz etkilerinden uzak, sağlıklı ürün elde etmede doku kültür laboratuvarları optimum koşullar sağlanabilmekte, doku kültürü metotları kullanılarak bitkisel üretimde kalite ve sürekli üretimi arttırmak mümkün olmakta ve hastalıklarla mücadele için geliştirilen ürünlerin çalışmalarının yapılması için önemli bir yer tutmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Rubus idaeus, Biyoteknolojik Yöntemler, Doku Kültürü

GİRİŞ

Ahududu bitkisi, Avrupa ve Kuzey Amerika'da uzun yıllardan beri kültüre alınmış olup, bu bölgelerde geniş alanlarda yetiştiriciliği yapılmaktadır. Meyvesinin değişik aroması ve güzel görünüşünden dolayı tüketici tarafından aranan bir meyvedir. Ahududu meyvesi ayrıca aromasından dolayı ilaç sanayinde ve gıda sektörünün değişik dallarında da kullanılmaktadır. Gıda sektöründe ahududu özellikle reçel, marmelat, içki, meyveli yoğurt ve pasta yapımında değerlendirilmektedir. Ayrıca dondurulmuş gıda olarak da piyasa sunulmaktadır. Taze tüketimi üretimin pazara yakın olduğu yöresel pazarlarda mümkün olmaktadır. Ülkemizde soğuk zincirin yaygınlaşması ve artan tüketici zevkleri ahududu meyvesi ve ürünlerinin talebini gittikçe artırmaktadır. Ülkemizde bu nedenlerden dolayı talebi artan bir meyve haline gelmiş ve üreticiye yüksek gelir getirmeye başlamıştır. Türkiye'de ticari ahududu yetiştiriciliği halen dağınık halde ve ufak aile bahçelerinde yapılmaktadır. Üzümstü meyveler grubunda yer alan ahududu ve böğürtlenler kendilerine özgü cezp edici renk ve tat aroması, yapı ve kokusu ile tüketim yanında gıda endüstrisinde çok çeşitli kullanım alanları bulmaktadır. Yüksek oranda su ihtiva eden taşıma ve depolanmaya uzun süre dayanamayan ahududu ve böğürtlenlerin taze tüketimi her zaman mümkün değildir. Bu sebeple çok çeşitli şekillerde; taze tüketimi olmakla birlikte konserve, reçel, marmelat, pasta, dondurma, şeker, yoğurt, meyve suyu, likör gibi çeşitli şekillerde tüketilmektedir. Bu nedenle öteki meyveler arasında çok özel bir yere sahiptirler (Pehlivan ve Güleriyüz 2000). Ayrıca ahududu ve böğürtlenler bünyelerinde bulundukları bazı pigmentler, fenoller, flavonlar, flavonoidler ve vitaminler ve liflerin diğer meyve türlerinden konsantrasyon bakımından çok yüksek oldukları belirtilmektedir. Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü ahududu çalışmasında Ahududu genetik kaynaklarının incelenmesinde RFLP (Parent ve Pagé, 1992), SSR (Graham ve ark., 2002; Graham ve ark., 2004, Stafne ve ark., 2005), AFLP (Graham ve ark., 2004) gibi moleküler teknik kullanılmakla birlikte, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)'inde bu türün tanısında kullanımı yaygındır. Bitkilerin genetik yapılarının incelenmesinde, PCR (Polimeraz Chain Reaction)'a dayalı RAPD yöntemi; tesadüfi kısa nükleotid diziliminden (10 mer'lik) oluşan primerlerin, çok az bitki DNA'sının kullanıldığı, kolay uygulanabilir ucuz bir yöntemdir (Williams ve ark., 1990). Parent ve ark. (1993), 13 kırmızı ve 2 mor ahududu çeşidini 19 RAPD primeri yardımıyla ayırt etmeye çalışmışlardır. Çalışma sonucunda 3 primerin bütün çeşitlerde ayırım sağladığını gözlemişlerdir. Yine Parent ve Pagé (1998), 13 kırmızı ve 2 mor ahududu çeşidini ayırt etmek amacıyla polimorfizm sağlayan 5 RAPD primeri belirlemişler ve çeşit ayırımında başarılı olmuşlardır. Graham ve ark. (1994), 10 kırmızı ahududu çeşidinde; 10 primer kullanmışlar ve 9 primerin çeşit tayininde çok başarılı sonuçlar verdiğini ortaya koymuşlardır. Graham ve ark. (1997), yabani ahududu çeşit/tiplerinin kültür çeşitleriyle genetik ilişkisini araştırmışlardır. Patamsyte ve ark. (2004), Litvanya'da bulunan yabani kırmızı ahududu gen kaynağının ayırt edilmesi ve parmakizlerinin çıkarılması amacıyla yaptıkları çalışmada, 44 RAPD primeri kullanmışlardır. 285 RAPD lokusundan %80'ni polimorfik olarak tespit etmişler ve R. idaeus germplasmasının ayırımı için uygun bulunmuşlardır. Bulgaristan'da yapılan bir diğer çalışmada 14 ahududu ve elit çeşitler materyal olarak kullanılmış, RAPD primerleri ile genetik farklılık başarılı bir şekilde tespit edilmiştir (Badjakov ve ark., 2006). Bu çalışmanın amacı, Karadeniz bölgesinden (Kastamonu, Bartın, Sinop, Ordu, Giresun, Trabzon, Rize ve Artvin) selekte edilen 15 ahududu tipinin, birbirleriyle genetik benzerlik oranlarını RAPD yöntemi ile belirlemek ve DNA parmakizlerini ortaya koymaktır. Ayrıca daha önceden Kaplan ve ark. (2003) tarafından belirlenen morfolojik özellikleri genetik bulgularla ilişkilendirilme amaçlanmıştır. Selçuk üniversitesinin ahududu çalışmasında BGAR'lerin bitki büyümesine etkisi direkt veya dolaylı olmaktadır (Glick 2012). BGAR'ler bitki gelişmesi, azot fiksasyonu, fosforun biyolojik olarak alınabilir hale gelmesi, siderofor yardımıyla bitkilerce demirin alınması, oksin, sitokinin ve gibberellin gibi bitkisel hormonların üretilmesi ve bitkide etilen düzeyinin azaltılması gibi mekanizmalarla bitki gelişmesini teşvik etmektedir (Glick 1995; Lucy ve ark. 2004). Bakterilerin bitki büyümesi, besin elementi alımı, bitki bünyesinde IAA ve sitokinin üretimi, bitki bünyesinde gibberellinlerin teşvik edilmesi gibi daha pek çok etkilerinin olduğu kirazda, elmada, çilekte, ahududunda, armutta ve dutta tespit edilmiştir (Sudhakar ve ark. 2000; Esitken ve ark. 2003; Köse 2003; Ozturk ve ark. 2003; Esitken ve ark. 2006; Orhan ve ark. 2006; Aslantaş ve ark. 2007; Ipek ve ark. 2014; Arikan ve Pirlak 2016; İpek ve ark. 2017a; İpek ve ark. 2017b). Bu çalışmada, 6 farklı rizobakteri izolatının "Heritage" ahududu çeşidinin bitki gelişimi, verim ve meyve kalite kriterleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü

Karadeniz Bölgesinden farklı ekolojik koşullara ve yükseltilere sahip alanlardan, özellikle ormanlardan seçilen 15 kırmızı ahududu tipinin birbirleriyle olan genetik benzerlik oranlarını ve DNA parmakizleri belirlemek amacıyla gerçekleştirilen bu araştırma, 20 RAPD primeri kullanılmıştır. Operon'un farklı primer grupları ile yapılan çalışmada 11 primerde polimorfik DNA bantları elde edilmiştir. DNA amplifikasyonu gerçekleşen 9 primerden toplam 55 RAPD bandı elde edilmiştir. Bu bantların 24'ü (%43) 15 ahududu tipleri için polimorfik, 31'i (%47) monomorfik band oluşturmıştır. Bant uzunlukları 200-2000 bp arasında değişmektedir. Elde etmiş olduğumuz markırlar ile UPGMA ve PCA analizleri sonucunda dendrogram ve grafik oluşturulmuştur. Değerlendirmede matrix korelasyonu (r) 0.81, mantel t-test (t) 4.93 olarak bulunmuştur. Polimorfik DNA bant verilerinin değerlendirilmesi sonucunda, Karadeniz'den seçilen 15 ahududu tiplerin birbirleriyle olan genetik benzerlik indeksi Çizelge 3'de verilmiştir. incelendiğinde, genetik benzerlik, Kastamonu-Taşköprü Kayadibi köyünden seçilen 37-01 ile Trabzon'dan seçilen 61-04 tipleri arasında %98 oranında belirlenmiştir. Buna karşılık birbirine genetik olarak en uzak (%57) tipler Rize (53-02) ve Artvin'den (08-02) seçilen tipler bulunmuştur. Artvin'in Ardavuş yaylasından seçilen 08-02 nolu tip diğer tiplere genetik benzerlik oranı %50-60 arasında değişmiştir. Seçilen 15 Ahududu tipinin genetik benzerlik indeksi %50 ile %98 arasında geniş bir dağılım göstermiştir. Elde edilen bu sonuç, Antonius-Klemola, (1999), Rubus 'larda yaptığı, ıslah amaçlı moleküler markır çalışmasında, heterozigot oranının fazla olduğunu bildirdiği çalışına ile uyumluluk göstermiştir. Tiplerde Kaplan ve ark. (2003) tarafından belirlenen fenotipik özelliklerden meyve rengi, meyve şekli, üzümçüklerin tanelenme özelliği de verilmiştir. Seçilen tipler fenotipik olarak birbirinden farklılık göstermektedir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü

Bu çalışmada, Onur ve ark. (1999)'nın 1996-1997 yılları arasında Karadeniz Bölgesinden seçmiş oldukları 27 kırmızı Bitkiden DNA İzolasyonu: DNA izolasyonu için sürgünlerin genç yaprakları kopartılmış, plastik torbalara konularak etiketlenmiş ve buz kutusunda laboratuara taşınmış, 0.5 gr yaprak sıvı azotta dondurularak ezilmiştir. DNA izolasyonu CTAB yöntemine göre yapılmıştır (Doyle ve Doyle, 1987). DNA konsantrasyonu %1'lik agaroz jelde DNA'ların yürütülmesi ile belirlenmiş, kontrol olarak λ DNA kullanılmıştır. DNA Sentezlenmesi: 10 bazlık olan 20 RAPD primeri kullanılarak PCR'da DNA sentezlenmesi yapılmıştır. PCR reaksiyonu: 30 ng-DNA, 3 mM MgCl₂, 200 mM dNTP, 2.5 µl Buffer (10 x PCR buffer), 5 pmol/µl primer ve 1 unit Taq polimeraz enzimi olacak şekilde 25 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. PCR döngüleri ise 1 döngü 94 o C'de 5 d; 35 döngü ise 94 o C'de 1 d, 38 o C'de 2 d, 72 o C'de 2 d; 1 döngü 72 o C'de 5 d olacak şekilde Perkin Elmer Cetus marka thermocycler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri, %2'lik agaroz jelde, 1 X TAE buffer içinde, 5 saatte 75 V'ta ayrıştırılmıştır. Jel, etidyum bromid ile boyanmış ve UV ışığında fotoğraflandırılmıştır. DNA Bantlarının Değerlendirilmesi: RAPD primerlerinin oluşturduğu polimorfik DNA bantları "1" (DNA bandı var) ve "0" (DNA bandı yok) olarak değerlendirilmiş, elde edilen veriler NTSYS-pc (Numerical Taxonomy Multivariate Analysis System) programında dendrograma dönüştürülmüştür. Ayrıca principle component analizi yapılmıştır (Rohlf, 1993). Seçilen 15 tipin, her RAPD primerinde ayrı ayrı birbiriyle olan benzerlik oranlarının değerlendirildiği benzerlik matrisinin oluşturulması ise Dice's coefficient (Dice, 1945) esasına göre yapılmıştır.

SONUÇ

Karadeniz Bölgesi'nden seleksiyon ıslahı sonucu seçilen 15 kırmızı ahududu tipinin, 11 RAPD primeri ile yapılan DNA analizi sonucunda genetik olarak birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç, seleksiyon çalışmasının başarılı olarak yapıldığını göstermektedir. Genetik benzerliğinin %50 ve %98 arasında değişmesi, Karadeniz bölgesinde bulunan Kırmızı ahududu tiplerinde genetik varyasyonun fazla olduğunu göstermektedir. Ayrıca birbirine yakın ve uzak bölgeler arasında gen akışının olduğu kanısına varılmıştır. Uygulaması kolay ve ucuz olan RAPD moleküler markır tekniğinin, kırmızı ahududu seleksiyon ıslahı ile seçilen tiplerin genetik farklılığını ve DNA parmak izlerinin belirlenmesinde başarılı bir şekilde kullanılabileceği tespit edilmiştir. Rizobakterin etkisi çalışmada ele alınan 6 bakteri izolatı arasında Staphylococcus arlettae MFDca-1 ve Alcaligenes faecalis 637Ca bakteri izolatları diğer bakteri izolatlarına göre "Heritage" ahududu çeşidinde incelenen bitki gelişim, verim ve meyve kalite özelliklerinde meydana getirdikleri artışlar ve iyileştirmeler bakımından diğer uygulanan bakteri izolatlarına göre daha etkin oldukları tespit edilmiştir. Biyoteknoloji alanındaki çalışmaların bir noktasında Ahududu bitkisi üzerindeki çalışmalardan 2 farklı örnekle hastalıklar ve çevresel stres faktörlerinin olumsuz etkilerinden uzak, sağlıklı ürün elde etmede doku kültür laboratuvarları optimum koşullar sağlanabilmekte, doku kültürü metotları kullanılarak bitkisel üretimde kalite ve sürekli üretimi arttırmak mümkün olmakta ve hastalıklarla mücadele için geliştirilen ürünlerin çalışmalarının yapılması için önemli bir yer olduğunu biyoteknoloji bölümünün ve çalışmalarının günümüz ve gelecek tarım bilimindeki değeri amaçlanmıştır.

KAYNAKLAR

Crandall, P.C. and H.A.Daubeny, 1990. Small Fruit Crop Management. Prentice Hall New Jersey, pp:157-213. Düzgünes, O., T.Kesici, O.Kavuncu ve F.Gürbüz, 1987. Araştırma ve Deneme Metodları (İstatistik Metodları II). Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 1021. Ankara Fidan, Y., S. Ağaoğlu ve H. Çelik, 1975. Ankara şartlarında yetiştirilen muhtelif ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin bazı özelliklerinin tespiti üzerine bir araştırma. Selven 2005 2(3) de yayınlanamamıştır. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. Cilt: 25: 905-917. Ankara. Kingston, C.M., E.M.O'Donoghue and W.Martin, 1991. Influence of cultural and harvesting methods on fruit quality of red raspberry. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. Vol: 19: 95-102. Shoemaker, J.M., 1954. Small Fruit Culture. Mc.Graw Hill Company, Inc. New York pp:231-321. Jennings DL (1988). Raspberries and blackberries: Their Breeding, Diseases and Growth, Academic press, London