

## Basit tekrarlı diziler arası polimorfizm (BTDAP=ISSR) tekniği ile yerli lüpen genotiplerinde (*Lupinus albus* L.) genetik varyasyonun belirlenmesi

Erdoğan Eşref HAKKI <sup>a,\*</sup>, Mustafa YORGANCILAR <sup>a</sup>  
Emine ATALAY <sup>a</sup>, Sultan UYAR <sup>a</sup>, Mehmet BABAOĞLU <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 42075 Kampus, Konya, Türkiye

### Determination of genetic variability at local lupin population (*Lupinus albus* L.) with inter simple sequence repeat polymorphism (ISSR) techniques

#### SUMMARY

This study was conducted to reveal the genetic variation of a *Lupinus albus* L. population that is mainly grown in Turkey. The polymorphism of the plants was determined via Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) molecular markers.

Economic potential of lupin production at the Göller region of Turkey is not only due to its profitability against the cereals at the marginal agricultural lands, but also due to its ability to improve the soil properties and efficiency. In terms of plant protein content lupin is a crop that competes with soybean. However, lupin is sensitive to calcareous soil, in order to increase its production area, more tolerant genotypes should be developed. It is evident that there should be enough genetic variation within the population. Hence, in this study we have determined that the lupin population from Desdiğin is quite heterogeneous and this wide biological variation is adequate for agricultural usage.

KEY WORDS: Lupin, ISSR, genetic variation

#### ÖZET

Bu çalışma Türkiye’de en fazla yetiştiriciliği yapılan Ak Acı lüpen (*Lupinus albus* L.) popülasyonundaki genetik varyasyonu ortaya koymak için yapılmıştır. Çalışmada Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm (BTDAP=ISSR) moleküler markörleri kullanılarak bitkilerin polimorfizmi belirlenmiştir.

Lüpen yetiştiriciliği yapılan yörelerdeki (Göller Bölgesi) kırıç tarım alanlarında az masrafla hububattan daha fazla bir gelir sağlanması, toprakları ıslah edici özelliğe sahip olması ve nadas alanlarının değerlendirilmesi yoluyla ekiminin yaygınlaşmasında ekonomik potansiyel taşımaktadır. Bitkisel protein üretimi açısından lüpen soya ile rekabet edebilecek durumdadır. Fakat lüpen kirece karşı toleranslı olmayıp, ekim alanının yaygınlaştırılması için kirece daha toleranslı olan genotiplerin bulunması, bunun için de bu konuda yeterli popülasyon içi varyasyonun bulunması gerekliliği ortadadır. Bu nedenle yapılan çalışmada, Lüpen tarımının yoğun olarak yapıldığı Dediğin kökenli lüpen popülasyonunun oldukça heterojen bir yapıya sahip olduğu ve bu geniş biyolojik çeşitliliğin tarımsal amaçlı kullanım potansiyelinin bulunduğu sonucuna varılmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Lüpen, ISSR, genetik varyasyon

## GİRİŞ

Lüpen, *Papilionaceae* (*Legumineae*; kelebek çiçekliler) familyasının *Lupinus* türüne dahil bir bitki olup, acı bakla, delice bakla, gavur baklası, kurt baklası, mısır baklası, termiye, yahudi baklası gibi değişik isimlerle bilinmektedir (Yorgancılar 1996). Lüpen genusu 300'den fazla tür içermektedir ancak bunlardan sadece 4'ü tarımsal öneme sahiptir. Bunlar, eski dünya türleri olan *Lupinus albus* (ak lüpen), *Lupinus angustifolius* (mavi ya da dar yapraklı lüpen) ve *Lupinus luteus* (sarı lüpen), ve tek yenedünya türü *Lupinus mutabilis*'dir. İlk üçü orijinini Akdeniz bölgesinden alırken *L. mutabilis* Güney Amerika orijinlidir (Hondelmann 1984). Türkiye'de tarımı yapılan lüpen türü ak acı bakla olup, tek yıllık yerel bir popülasyondur.

Ak acı lüpen (*L. albus* L.) kireçli topraklara hassas bir bitki (Kerley ve Huyghe 2001) olduğu için tarımı Türkiye'de genellikle düşük kirece ve pH'ya sahip Göller Bölgesi (Akşehir, Beyşehir, Eğridir ve Doğanhisar) topraklarında yaklaşık 5000 da alanda yapılmaktadır (Anonim 2004). Bu nedenle bu bitkinin tarımı kısıtlı kalmakta ve Türkiye'de tanınmamaktadır. Halbuki lüpen yüksek protein oranına sahip (%28-47.6) ve diğer baklagillerin yetişmediği marjinal alanlarda yetişebilme kabiliyetinde olan özel bir bitkidir (Yorgancılar ve ark. 2007). Yüksek protein içeriği sebebiyle soya fasulyesinin dünyada sahip olduğu haklı popülerliği göz önüne alındığında daha yüksek değerlere sahip olan lüpenin ihmal edilmişliği ortadadır. Ülkemizde bitkinin yaygınlaşmasını engelleyen en önemli unsur bitkinin toprak isteklerinin tarım alanlarımızda yeterince karşılanamamasıdır.

Özkaynak ve ark. (1994), çeşitli lüpen türlerine (*L. albus*, *L. luteus* ve *L. angustifolius*) ait varyetelerin adaptasyonunu araştırdıkları çalışmada yerel *L. albus* genotipinin 340 mg protein g<sup>-1</sup> içeriği ile diğer genotiplerden belirgin şekilde ayrıldığını, sadece Amiga ve Lolita çeşidinin bunun üzerinde protein oranına sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Mülayim ve ark. (2002), 1993-1994 yıllarında göller bölgesinde iki yıl süre ile yürüttükleri bir çalışmada bir yerel popülasyonunun (acı) ve 2 adet tatlı lüpen çeşidinin (Amiga ve Lolita) bazı agronomik özelliklerini araştırmışlar, deneme sonunda tatlı çeşitlerin (alkaloid içermeyen) verim ve verim özelliklerinin yerel popülasyona göre daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. Yerel popülasyonun olumsuz iklim faktörlerinden ve *Fusarium* spp. hastalığından daha az etkilendiklerini ifade etmişlerdir. Bu anlamda yerel lüpen popülasyonunun sahip olduğu genetik varyasyonun belirlenmesi, tarım alanlarımızın sahip olduğu toprak özelliklerine uygun bitkilerin tespit edilmesi (örneğin yüksek pH ve kireç veya hastalık stresi ortamlarında bitkilerin yetiştirilmesi ve uygun olanların seçimi) gerektiği vurgulanmıştır.

Son yıllarda dünyada olduğu gibi ülkemizde de genotipik farklılıkların belirlenmesinde ve bazı tarımsal özelliklerin seçiminde RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) ve ISSR gibi standart moleküler genetik laboratuvarlarında rahatlıkla uygulanabilen

moleküler markör tekniklerin kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır (Fafona ve ark. 1997, Mayers ve ark. 2004, Köksal ve ark. 2005, Yorgancılar ve ark. 2007). Her iki sistemin de çok başarıyla uygulandığı farklı konularda çok sayıda araştırma mevcuttur.

Talhinhas ve ark. (2003), AFLP, ISSR ve RAPD markörleri kullanılarak lüpen türleri (*L. albus*, *L. angustifolius*, *L. cosentinii*, *L. hispanicus*, *L. luteus*, *L. mutabilis*, *L. pilosus* ve *L. polyphyllus*) arasındaki genetik farklılıkların ortaya çıkarılması çalışmasında eski dünya türleri ile yeni dünya türlerinin birbirinden ayrıldığını ve bunlardan *L. albus* dışındaki, türlerinin büyük oranda birbirlerine genetik olarak benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada yerel acı lüpen popülasyonuna ait bitkilerde popülasyonun genotipik dağılımı ISSR primerlerinin kullanıldığı PCR amplifikasyonları ile incelenmiş ve yerel çeşitlerin polimorfizm düzeyi belirlenmiştir. Yerel popülasyonun sahip olduğu çeşitliliğin tespiti ile yukarıda bahsedilen konularda yürütülecek bitki ıslahı çalışmalarının doğru bitkilerle başlatılabilmesine katkı sağlanması amaçlanmaktadır.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Materyal:

Bu çalışmada materyal olarak, *Lupinus albus* türüne ait Türkiye Göller Bölgesi kökenli yerel lüpen popülasyonuna ait acı formda olan bitki tohumları kullanılmıştır. Denemede kullanılan tohumlar Konya İli, Doğanhisar İlçesi, Deşdiğin Kasabasında yetiştirilmekte olan lüpen tohumlarından temin edilmiştir.

### Materyalin serada yetiştirilmesi:

Bitkiler bilgisayar kontrollü (ısı, nem, radyasyon) sera ortamında saksılarda yetiştirilmiştir. Bitkileri yetiştirmek için pH'sı 6.2 ve düşük kireç oranına sahip, lüpen tarımının yaygın olarak yapıldığı Konya İli Doğanhisar İlçesi Deşdiğin Kasaba'sından getirilen topraklar kullanılmıştır. Topraklar 10 litrelik saksılara 4 mm'lik elekten geçirildikten sonra 9 kg tartılarak konulmuştur. Her saksıya 5'er adet olacak şekilde tohumlar ekilmiştir. Bitkiler ihtiyaç doğrultusunda belirli aralıklarla düzenli olarak saf su ile sulanmıştır.

### Yöntem:

#### a. DNA örneklerinin alınması:

DNA izolasyonu için örnek alınacak bitkiler numaralandırılarak etiketlenmiş ve çıkıştan 3 hafta sonra popülasyonu temsilen 18 bireyin en genç yapraklarından 2 set halinde 200 mg yaprak materyali alınmıştır. Sıvı azotta dondurulan örnekler -80 °C'de DNA izolasyonlarına kadar muhafaza edilmiştir.

#### b. DNA izolasyonları:

DNA izolasyonları, 18 farklı bireyden alınmış yapraklar kullanılarak 2x CTAB metoduna göre

yapılmıştır. İzolasyon sırasında 4 µL RNase (Qiagen 1 ng/µL) kullanılarak numuneler RNA'dan temizlenmiştir. İzolasyon sonrası DNA'ların konsantrasyonları ve saflığı, biyofotometrede (Eppendorf) belirlenmiş ve agaroz jel elektroforezi ile UV görüntüleme sisteminden (Vilber Lourmat, Fransa) yararlanılarak (konsantrasyonu belli olan EcoRIHindIII eşliğinde %1'lik agaroz jelinde yürütülerek) DNA kalitesi saptanmış ve PCR çalışmaları için tercih edilen 25 ng/µl olacak şekilde DNA dilüsyonları hazırlanarak -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

#### c. ISSR Amplifikasyonları:

Çalışmada kullanılan 8 adet (Çizelge 1) ISSR primeri toplam 50 adet primer arasından ön elemeye polimorfik fragman üreten ISSR primerleri arasından seçilmiştir. ISSR primerleri ile PCR amplifikasyonları en az iki kere tekrarlanmış ve bu tekrarlar üretilen bantlar skorlamalarda dikkate alınmıştır. Reaksiyonlar, 6 µL DNA (25 ng/µL) ve 19 µL

reaksiyon karışımı [2.5 µL 10X PCR tampon çözeltisi (Fermentas), 2.5 µL 25 mM Mg<sup>2+</sup> (Promega), 0.4 µL dNTP (Larova), 0.3 µL Taq DNA Polimeraz (Bioron), 0.5 µM primer ve 12.8 µL PCR suyu] ile 40 döngü touchdown PCR yapılarak kullanılan primerlerin Tm sıcaklıkları dikkate alınarak standart amplifikasyon sıcaklıklarında gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri %2'lik agaroz (Sea Kem Agaroz) jel elektroforez ile yürütülmüş ve Vilber Lourmat (Fransa) görüntüleme sistemiyle görüntülenmiştir.

**d. ISSR verilerinin analizi:** ISSR primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR amplifikasyonları sonucunda elde edilen bantlar örneklerde bulunup bulunmadığı esas alınarak var/yok durumuna göre 1 ve 0 olarak skorlanmış, bu skorlar bilgisayar ortamına aktarıldıktan sonra genetik analizler NTSYS-pc 2.1 programı ile yapılmış ve UPGMA yöntemine göre genotipik yakınlığı gösteren dendrogram oluşturulmuştur.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan ISSR primerleri.

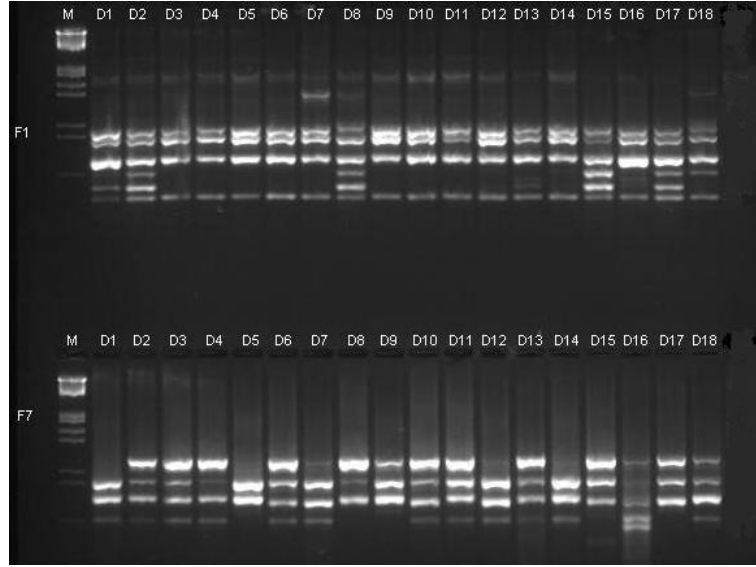
| Primer     | Sekans                           | Tm (°C)     | Primer uzunluğu (bp) | G/C oranı (%) |
|------------|----------------------------------|-------------|----------------------|---------------|
| F1         | 5' GAGCAACAACAACAACAA 3'         | 49.1        | 18                   | 38.9          |
| F2         | 5' CTCGTGTGTGTGTGTGTGT 3'        | 56.7        | 19                   | 52.6          |
| F3         | 5' AGAGAGAGAGAGAGAGCG 3'         | 56.0        | 18                   | 55.6          |
| F5         | 5' AGAGAGAGAGAGAGAG 3'           | 49.2        | 16                   | 50.0          |
| F6         | 5' CCACCACCACCACCA 3'            | 53.3        | 15                   | 66.7          |
| F7         | 5' ACACACACACACACAC 3'           | 49.2        | 16                   | 50.0          |
| F9         | 5' GAAGAAGAAGAAGAA 3'            | 39.6        | 15                   | 33.3          |
| <b>M 1</b> | <b>5' AGCAGCAGCAGCAGCAGCG 3'</b> | <b>61.3</b> | <b>19</b>            | <b>68.4</b>   |

#### BULGULAR ve TARTIŞMA

Ekonomik olarak sınırlı üretimin gerçekleştirildiği Konya İli Doğanhisar İlçesi Deşdiğin kasabasına ait pH'sı 6.2 olan düşük kireçli toprağın kullanımı ile yerel popülasyona ait bitkiler kontrollü sera saksı ortamında başarıyla yetiştirilmiştir (Şekil 1). Lüpemde önemli agronomik özellikler ve farklı iklim ve coğrafik koşullara adaptasyon yeteneği bakımından türler arası olduğu kadar bu bitkinin tür içinde de önemli morfolojik farklılıklara sahip olduğu gözlenmiştir.

Üç haftalık bitki örneklerinin yapraklarından alınan numunelerden izole edilmiş olan DNA örneklerinin PCR koşullarına uygun standart dilüsyonları hazırlandıktan sonra amplifikasyonlarda bu DNA'lar kullanılmıştır. Çalışmada uygulaması kolay, güvenilir ve maliyeti düşük olması dolayısıyla dominant moleküler belirleyicilerden ISSR kullanılmıştır. Ön çalışmada seçilen ve analizlerde kullanılan ISSR primerlerinin sekansları ile Tm ve G/C oranları Çizelge 1'de yer almaktadır. Seçilen primerlerin büyük

çoğunluğu daha önce fasulye gen havuzunun genetik çeşitliliğinin belirlenmesinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Galvan ve ark. 2003). Benzer laboratuvar imkânları ile gerçekleştirilebilen RAPD yöntemi, tekrarlanabilirliği genelde daha zayıf olması dolayısıyla bu çalışmada tercih edilmemiştir. ISSR primerleri ile yapılmış olan amplifikasyon ve üretilen bantlara ait iki jel örneği Şekil 2'de sunulmuştur. Kullanılan tüm primerlere ait elde edilen skorlanabilir bantlar ve bunların polimorfizm yüzdeleri (Çizelge 2) incelendiğinde en fazla bant (15) ile en fazla polimorfik bant sayısı (15) ve polimorfizm yüzdesi en yüksek olan primer (%100) F3 primeri olmuştur. En düşük bant sayısı (6), en düşük polimorfik bant sayısı (2) ve polimorfizm yüzdesi (%33.3) de F6 primerinden elde edilmiştir. Çalışmada toplam üretilen skorlanabilir 90 adet banttan 80'ninin (%88.9) polimorfik olduğu gözlenmiştir. Üretilen bantların tekrarlanabilir olması (güvenilirlik) ve de yüksek polimorfizme sahip olması (skorlanabilirlik) daha fazla farklı lokusların taranmasını gereksiz kılmıştır.



Şekil 1. Yerel lüpen popülasyonunda F1 ve F7 primeri ile yapılan PCR ürünlerinin agaroz jelde elde edilen görüntüsü

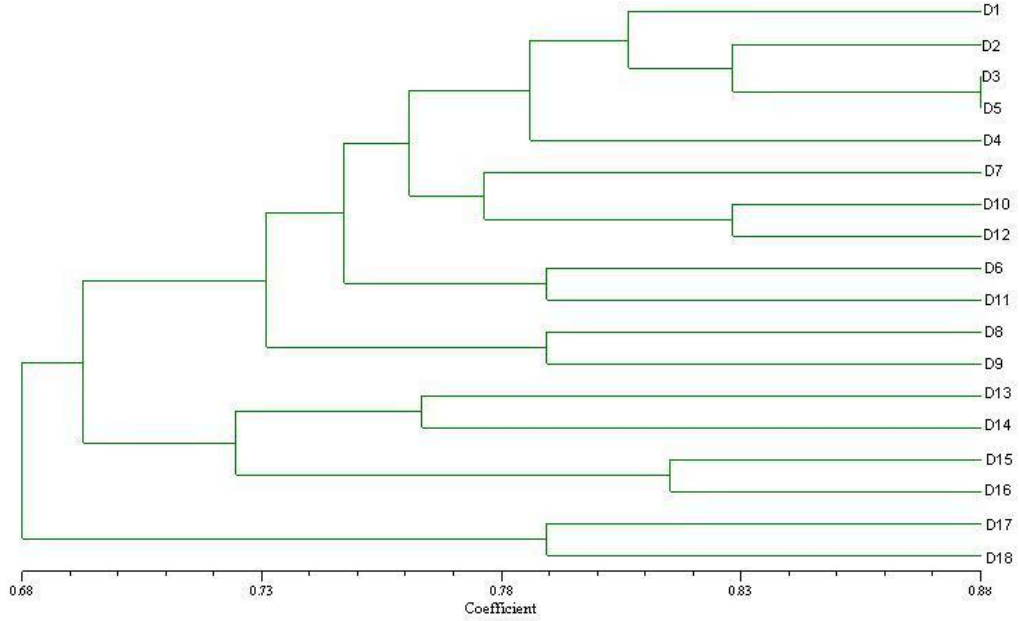
Çizelge 2. ISSR primerleri ile elde edilen skorlanabilir bantlar ve bunların polimorfizm yüzdeleri

| Primer        | Primer Sekansı | Bant Sayısı | Polimorfik Bant Sayısı | Polimorfizm (%) |
|---------------|----------------|-------------|------------------------|-----------------|
| F1            | GAG(CAA)5      | 8           | 5                      | 62.5            |
| F2            | CTC(GT)8       | 11          | 10                     | 90.9            |
| F3            | (AG)8CG        | 15          | 15                     | 100.0           |
| F5            | (AG)8          | 9           | 8                      | 88.8            |
| F6            | C(CAC)4CA      | 6           | 2                      | 33.3            |
| F7            | (AC)8          | 14          | 14                     | 100.0           |
| F9            | (GAA)5         | 8           | 7                      | 87.5            |
| M 1           | (AGC)6G        | 19          | 19                     | 100.0           |
| <b>Toplam</b> |                | <b>90</b>   | <b>80</b>              | <b>88.9</b>     |

Araştırma sonucunda skorlanabilen bantlardan NTSYS-pc 2.1 programı ile elde edilen, genotipik varyasyonun sergilendiği UPGMA dendogramı Şekil 2'de verilmiştir. Burada da görüldüğü gibi bireyler iki temel grupta toplanmıştır. Bunlar D17 ve D18'in yer aldığı grup ile diğer tüm bireylerin bulunduğu gruplardır. Büyük dalı oluşturan gruptaki bireylerin de kendi içinde eşit uzaklıkta (~%70 benzerlikle) yer alan iki farklı kümeyi oluşturduğu görülmüştür. Sonuç olarak Deşdiğin kökenli yerli lüpen popülasyonunun oldukça heterojen bir yapıya sahip olduğu ve bu geniş biyolojik çeşitliliğin tarımsal amaçlı kullanım potansiyeline sahip olduğu söylenebilir.

Lüpen Türkiye'de yetiştiriciliği yapılan yörelerdeki kıraç tarım alanlarında az masrafla hububattan daha fazla bir gelir sağlanması ve nadas alanlarının değerlendirilmesi nedeniyle ekiminin yaygınlaşmasında ekonomik potansiyel taşıyan bir bitkidir. Ancak ekilen tohumlar popülasyon düzeyinde

olup çeşit özelliğinde değildirler. Özellikle ıslah çalışmaları için zengin bir genetik taban oluşturması açısından popülasyonlarda polimorfizmin bulunması arzu edilen bir durumdur. Yıllardır çiftçinin kullandığı tohumlardaki bu genetik çeşitlilik değerlendirilerek ülkemiz koşullarına uygun, lüpen çeşidi ıslah etmek mümkündür. Lüpen bitkisinin *Fusarium spp.* gibi fungal enfeksiyonlara çok hassas oluşu sebebiyle tarımı yapılan bölgelerde ciddi verim kayıpları oluşmaktadır. Bu yöndeki çalışmalar polimorfik farklılık gösteren bireylerin belirlenmesi ve buradan hareketle bölge şartlarında en iyi yetişebilen genotiplerin ortaya konması, hastalıklara dayanıklı bireylerin tespiti ve bunların çoğaltılarak kullanılması bakımından önem arz etmektedir. Elde edilen bu genotipik farklılıklar sadece hastalık için değil kirece dayanıklılık gibi lüpen tarımını kolaylaştıracak diğer ıslah konularında da büyük yarar sağlayacaktır.



Şekil 2. Yerel lüpen popülasyonunda bireylere ait UPGMA dendrogramı.

## SONUÇ

Bir baklagil bitkisi olan lüpenin danesi ve otunun hayvanlar için iyi bir besin kaynağı olması, bazı çeşitlerinin süs bitkisi, yeşil gübre, ilaç bitkisi ve çerezlik olarak kullanılmasının yanında yüksek yaylalarda, kıraç şartlarda yetişebilmesi gibi özellikleri nedeniyle lüpende yapılacak her türlü araştırma bu bitkinin Türkiye'deki ekonomik öneminin artmasına katkıda bulunacaktır. Römer ve Weissmann (1990), Avrupa'da erken olgunlaşan, yüksek verimli ve alkaloid içermeyen bitkilerin, lüpen ıslahında temel noktaları oluşturduğunu söylemişlerdir. Bu nedenle popülasyon içi varyasyonun geniş olarak gözükmesine karşın, kirece toleranslılık, alkaloid içermeme (tatlı) ve hastalıklara dayanıklılık gibi özelliklerin bulunup bulunmadığı daha ileri araştırmalarla incelenmelidir.

## KAYNAKLAR

- Anonim (2004) Konya Tarım İl Müdürlüğü İstatistik Şubesi Verileri.
- Fafona B, Vekemans X, Jardin P du, Baudoin JP (1997) Genetic diversity in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by RAPD markers. *Euphytica* 95 (2): 157-165.
- Galvan MZ, Bornet B, Balatti PA, Branchard M (2003) Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessment of both genetic diversity and gene pool origin in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica* 132: 297-301.
- Hondelmann W (1984) The lupin-ancient and modern crop. *Theor App Genet.* 68: 1-8.
- Kerley SJ, Huyghe C (2001) Comparison of acid and alkaline soil and liquid culture growth systems for studies of shoot and root characteristics of white lupin

(*Lupinus albus* L.) genotypes. *Plant and Soil.* 236 (2): 275-286.

- Köksal N, Cansev A, Gülen H, İpek A, Eriş A. (2005) Bazı yerel fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) genotipiklerinin arasındaki akrabalık ilişkilerinin belirlenmesi. XIV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi. 31 Ağustos-2 Eylül, Eskişehir.
- Mayers JR, Davis JW, Kean D, Yorgey B (2004) Genetic analysis of processing traits in green bean (*Phaseolus vulgaris*). *Acta Hort.* 637: 369-375.
- Mülayim M, Tamkoç A, Babaoğlu M (2002) Sweet white lupins versus local bitter genotype: agronomic characteristics as effected by different planting densities in the Gölle region of Turkey. *European of Agronomy* 17: 181-189.
- Özkaynak İ, Mülayim M, Tamkoç A, Babaoğlu M, Topal A (1994) Konya şartlarında yetiştirilen yerel lüpenle yabancı kökenli acı ve tatlı lüpenlerin karşılaştırılması. Tarla Bitkileri Kongresi, Cilt: III. Sayfa: 32-35, Çayır-Mera ve Yem Bitkileri Bildirileri, E.Ü.Z.F. Tarla Bitkileri Bilimi Derneği Tübitak ve Üsigem, Bornova-İzmir.
- Römer P, Weissmann E (1990) Perspectives of practical lupin breeding. In *Proc. VIth Int. Lupin Conf.*, Temuco, Chile pp. 350-362.
- Talhinhas P, Neves-Martins J, Leitao J (2003) AFLP, ISSR and RAPD markers reveal high levels of genetic diversity among *Lupinus* spp. *Plant Breeding* 122: 507-510.
- Yorgancılar M (1996) Doğanhisar'da Lüpen Ziraati, Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Lisans semineri.
- Yorgancılar M, Babaoğlu M, Hakkı EE, Atalay E (2007) Farklı Orijinli Lüpen (*Lupinus* sp.) Genotiplerinde Kirece Dayanıklılığın ve Genetik Akrabalık İlişkilerinin Araştırılması. TÜBİTAK Proje No: TOVAG-105O034.