Konya Yöresinden Derlenen Yıldızçiçeği *Dahlia* cav. Genotiplerinin Moleküler Karakterizasyonu

Bahar Banu Batı[1], Mustafa Paksoy[1], Fatma Akın[2], Necibe Kayak[1], Erdoğan Eşref Hakkı[2,*]
[1]Selçuk Üniversitesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Konya
[2]Selçuk Üniversitesi, Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü, Konya
e-posta : eehakki@selcuk.edu.tr**Özet**

21. yüzyılda teknolojinin gelişmesi ve değişen dünya şartları, günümüz şehir insanının doğal yeşil ortamdan uzaklaşmasına sebep olmuştur. İnsan ruhunun yeşil çevreye ihtiyacını park ve bahçeler karşılamaktadır. Şehirlerde kurulan park ve bahçelerdeki süs bitkilerini ağırlıklı olarak geofitler oluşturmaktadır. Son zamanlarda ülkemizde de beğeni kazanan süs bitkilerinden biri de yıldızçiçeğidir. Yıldızçiçeğinin asıl anavatanı Meksika'dır. Meksika'nın yüksek dağlarında yetişmekte olan yıldızçiçeği, ülkenin ulusal bitkisi olarak da kabul edilmiştir. Amerika'dan Avrupa'ya taşınarak gelen yıldızçiçeği, oradan da ülkemize gelmiştir. Konya'ya ise ne zaman getirildiği tam olarak bilinmemektedir. Asteraceae familyasına bağlı olan yıldızçiçeği Dahlia cav. Konya'da bahçeli ev ve konaklarda hobi amaçlı yetiştirilmektedir. Sahip olduğu zengin renk, taç yaprak ve boy çeşitliliği ile insanların beğenisini kazanmıştır. Konya'dan derlenen yıldızçiçeği genotiplerinin moleküler karakterizasyonunun yapılması ve bitkinin tanınması bu süs bitkisinin ıslahı açısından önemlidir. Bu çalışma, Konya yöresinden derlenen 17 yıldızçiçeği genotipinin moleküler yöntemlerle akrabalık derecelerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Moleküler karakterizasyon işlemi ise günümüz biyoçeşitlilik çalışmalarında kullanılan metodlardan biri olan ISSR yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. ISSR metodu ile 80 DNA fragmenti üretilmiştir, bunların 75'i polimorfiktir. Polimorfizm oranı ise %88.3 olarak bulunmuştur. Elde edilen veriler NTYSY pc paket programı ve Minitab istatistik programı ile analiz edilmiştir. UPGMA metodu ile genotipler arasındaki genetik ilişkiyi ortayan koyan dendrogram oluşturulmuş ve ayrıca iki boyutlu temel bileşenler analizi gerçekleştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Yıldızçiçeği, *Dahlia* cav., moleküler karakterizasyon, ISSR

Determination of Moloculer Characterisation of *Dahlia* cav. Genotypes from Konya Region

Abstract

The changing situation of world and developing technology in 21.century caused a seperation between todays human and green nature.The need of green environment of the human spirit can be satisfying by gardens and parks. Geofits takes shape generally ornamental plants of park and garden of cities. Recently, Dahlia is getting popular an ornamental plant. The nativeland of Dahlia is Mexico. It is grown in high mountain of Mexico and accepted as a national plant in Mexico. Dahlia had moved Europe from America, than Anatolia. It is unknown exactly when it came to Konya. Dahlia cav. of Asteraceae family has been growing in Konya for hobby purpose in gardens and mansions. It's been admired by people for the rich color, petal and height variety of Dahlia. This study was conducted to determine of phylogenetic relationship of 17 genotypes of Dahlia which were collected in Konya region. ISSR method was chosen as a molecular characterisation procedure is used in modern breeding studies. We generated 80 DNA fragments through ISSR method, 75 was polymorphic. The polymorphism rate found %88.3. The data was analysed with NTYSY pc program and Minitab static program. The dendogram was created to show genetic relationship of genotypes according to UPGMA method. It was performed two dimensional principal component analysis.

Keywords: Dahlia, *Dahlia cav*., molecular characterisation, ISS

Giriş

Anavatanı Meksika olan ve bu ülkenin de ulusal çiçeği olarak kabul edilen *Dahlia ssp.* (yıldızçiçeği) papatyagiller (*Asteraceae)* familyasına bağlı bir süs bitkisidir. 18.yy'ın başlarında Meksika'dan İspanya'ya getirilen bu bitkiye ismini, Carl Linnaeous'un öğrencisi olan Andre Dahl anısına Antonio Jose Cavanilles vermiştir. Bu bitkinin kültüre alınması da Cavanilles'in çabaları ile Madrid'te bulunan Royal Botanic Garden'da başlamıştır. Cavanilles'in yıldızçiçeğini tanımladığı ilk 27 tür, Meksika'nın geniş platolarında veya yüksek dağlarında yetişen yıldızçiçeklerinden oluşmaktaydı. İsmi Cavanilles tarafından verilen ilk yıldızçiçekleri ise *Dahlia pinnata* ve *Dahlia rosea'*dır (Wegner ve Debener, 2008). Bahçe çalışmalarına büyük önem veren ve özen gösteren Azteklilerin bahçelerinde de yıldızçiçeklerine rastlanmaktadır. Asilzadelerin önemli uğraşlarından biri olan bu bahçelerde yetişen yıldızçiçeklerinin yumruları da medikal

amaçlar için pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmaktaydı (Sorensen, 1970).

21.yy'a geldiğimizde ise yıldızçiçeğinin tür sayısının çok daha fazla olduğunu görmekteyiz. Bu zenginlik ise yıldızçiçeğinin çiçek şekli, renk ve gövde uzunluğu gibi farklılıklarından kaynaklanmaktadır. Yıldızçiçeğinin bazı türleri 6 metreye kadar uzayabilirken, bazıları ise bodur karakter gösterip 15 cm kadar uzamaktadır. Bitkinin üst aksamında yaprak, gövde, sap ve çiçek bulunurken alt aksamında ise kök ve yumru bulunur (Alp, 2008).

Yıldızçiçeği yaz mevsimi dışında güz mevsiminde de çiçek açabiliyor olması ile çiçekli bitkilerin sonbaharda azalmasından mütevellit peyzaj ve dış mekan düzenlemelerinde çiçekli bitki ihtiyacına cevap vermektedir. Sonbaharda ilk soğuk havaların gelmesi ile çiçekleri hasar görmeye başlamakta ve bu dönemde yumrularının toplanıp soğuk depolarda saklanılması gerekmektedir. Böylece bir sonraki sezon bu yumrular dikilip yeniden yetiştirilebilmektedir (Alp, 2008).

Orta Amerika'nın bu güzel süs bitkisinin Konya'ya nasıl ve ne şekilde geldiği ve Konya'da kullanılan "hüsnü yusuf" isminin de kaynağı bilinmemektedir. Yıldızçiçeklerin yetiştirilmesi ve çiçek renk çeşitlerinin artırılması ise yetiştiriciler ve meraklıları tarafından takas yolu ile büyük bir ciddiyet ile yapıldığı söylenebilir. Diğer süs bitkileri ile karşılaştırıldığında çok sayıda çiçek vermesi, çok sayıda farklı renk tonlarına ve farklı çaplarda çiçek tablasına sahip olması bitkiyi yetiştiricilerine ve meraklılarına daha cazip kılmaktadır. Bitkinin soğanlarının takas yolu ile değişimi insanların sosyal ilişkilerine farklı bir boyut da katmaktadır. 1950li 60'lı yıllarda farklı renklerde bu çiçeğe sahip olmanın kıskançlığa neden olduğu da söylenmektedir (Batı, 2014; Direk, 2015).

Yıldızçiçeklerinin yetiştiriciliğinin son bir asırdır yoğun bir şekilde yapılıyor olmasına rağmen Konya'da yetiştirilen yıldızçiçeklerinin moleküler düzeyde tiplendirmesi henüz yapılmamıştır. Konya'da yetiştirilen yıldız çiçekleri gövde boylarına göre bodur, yarı bodur ve uzun boy karakteri göstermektedir. Şu anda peyzaj ve dış mekan düzenlemelerinde bodur boyda olan türlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla bodur veya yarı bodur karakterdeki yıldızçiçeklerinden 17 genotip moleküler düzeyde karakterizasyon yapmak amacıyla Konya yöresinden derlenmiştir. Moleküler karakterizasyon için PCR temeli bir markör sistemi olan ISSR (**I**nter **S**imple **S**equence **R**epeats) tercih edilmiştir (Kayış ve ark., 2010). Klasik ıslah çalışmaları, bitki ıslahçılarının günümüzdeki ihtiyaçlarına cevap verme konusunda tek başına yeterli olmamaktadır. Moleküler karakterizasyon çalışmalarınında katkısı ile ıslah çalışmalarında ebeveyn seçimi çok daha hızlı gerçekleştirilebilmektedir. Wegner (2008) 'in yaptığı çalışmada ise başka bir markör sistemi olan AFLP metodu ile 3 Dahlia yabani tipleri ve 19 hibrit kültür bitkisi arasında moleküler düzeyde karakterizasyon gerçekleştirilmiş ve 1432 AFLP DNA fragmenti üretilmiştir. Bu çalışma ile elde ettikleri 1432 DNA fragmentinin 1096'sı polimorfik özellik göstermiştir, yani polimorfizm oranı %76.5'tir (Wegner ve Debener, 2008). ISSR metodu ise aralarında *Cannabis sativa,* Jurinea (Asteraceae), *Triticum aestivum, Triticum durum* ve Cicer türlerinin de yer aldığı pekçok genetik materyalin moleküler karakterizasyonu için kullanılmıştır (Dogan ve ark., 2007; Hakkı ve ark., 2007; Khan ve ark., 2015; Oztürk ve ark., 2013).

Materyal ve Yöntem

Bu çalışmada kullanılan Dahlia türlerinin 12 tanesi bodur, 5'i yarı bodur karakterde olup bu genetik materyal Konya yöresinden derlenmiştir. Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümüne ait seralarda yıldızçiçekleri yumrudan yetiştirilmeye alınmıştır. Moleküler karakterizasyon çalışmaları ise Selçuk Üniversitesi Bitki Biyoteknolojisi ve Moleküler Genetik Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Karakterizasyon için bitkiden DNA izolasyonu Doyle&Doyle CTAB protokolünde bazı küçük değişiklikler yapılarak 0,1-0,2 g taze yapraktan gerçekleştirilmiştir (Doyle, 1991). ISSR primerlerinin kullanıldığı PCR reaksiyonlarında daha verimli olduğu için touchdown PCR tercih edilmiştir (Kayış ve ark., 2010). Bitkilerden elde edilen DNA örneklerinin her biri 50 ng/µl olacak şekilde eşit hale getirilmiştir. PCR reaksiyonları Thermo Fisher Scientific Taq DNA polymerase enzimi ile VWR ve Techne marka PCR cihazlarında gerçekleştirilmiştir. Bitki DNA örnekleri 20 adet

ISSR primeri ile testlemeye tabi tutulmuştur ve polimorfik DNA fragmenti üreten ve çalışan 11 adet ISSR primeri ile PCR reaksiyonları tekrarlı şekilde tamamlanmıştır. Amplifikasyon ürünleri %1,5'luk agaroz jelde yürütülmüştür ve Vilber Lourmat jel dökümantasyon sisteminde görüntülenmiştir. Elde edilen bantlar var/yok esasına göre 0/1 olarak dominant markör sisteminin özelliğine uygun olarak skorlanmış ve skorlamalardan *simple matching coefficient* katsayısına göre elde edilen matrisin NTSYS pc 2.0 paket programı kullanılarak dendrogramı üretilmiş ve örneklerin genetik akrabalıklar dereceleri belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen matris kullanılarak Minitab 2.0 paket programı ile iki boyutlu temel bileşenler analizi de gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan polimorfik DNA fragmenti üreten primer listesi ve polimorfizm oranları Çizelge-1'de verilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Analizlerde kullanılan DNA örneklerinin yeter kalitede ve miktarlarda elde edilmesine özen gösterilmiştir. Yaygın kullanımı olan CTAB metodu 200 ng/uL ve üzerinde DNA miktarlarının elde edilmesini sağlamıştır. Bu DNA örneklerinin genellikle A260/A280 oranlarının 1.8 ve üzerinde olduğu görülmüştür. Buna göre çok fazla seçici olmayan ISSR yönteminde kullanılabilecek miktarda ve yeterli kalitede DNA üretilmesi sağlanmıştır. Bu DNA örneklerinden sabit konsantrasyonda dilüsyonlar yapılarak örneklerdeki amplifikasyonu yapılan fragmanlarının, eşit miktarlarda kalıplar kullanımına bağlı olarak, oldukça homojen yanılma değerine sahip bantların güvenilir bir şekilde üretilmesi sağlanmıştır. Nitekim tekrar denemelerinde amplifikasyon ürünlerinin güvenilir bir şekilde üretimi sağlanabilmiştir. Dahlia gibi genomik bilginin sınırlı olduğu organizmalar için kullanımının uygun olacağını düşündüğümüz ISSR metodunda kullanılan primerlerin benzer mantıkla çalışan ve yine aynı şekilde dominant karakterde ürün veren ve 1/0 olarak skorlanan RAPD gibi markörler karşısında seçilmiş bu yöntemin daha güvenli sonuç ürettiği aşikardır. Aynı düşünceye bağlı olarak kullanılabilecek AFLP gibi yine sekans bilgisi gerektirmeyen bir diğer markör sistemine göre de bazı avantajlar taşımaktadır. Herşeyden önce, az miktarda DNA ile sadece bir tek primer kullanılarak PCR ile doğrudan sonuç veren bir yöntem olması dolayısıyla, birçok adımdan oluşan, yüksek kalitede DNA gerektiren ve PCR ile restriksiyon enzimlerinin kullanıldığı kesim aşamaları ve adaptör bağlama aşamaları gibi farklı uygulamaları olan AFLP'den çok daha ucuz ve hata yapma oranı düşük bir yöntem olarak da bazı avantajlara sahip bir markör sistemi (ISSR) seçilmiştir. ISSR, RAPD yönteminden farklı olarak uzun primerlerin kullanılması, daha yüksek Tm değerlerine sahip bu primerlerle amplifikasyonları ve tutarlılığı doğal olarak artmış bir yöntemdir. Moleküler karakterizasyonda kullanılan ISSR primerlerinden yüksek düzeyde polimorfizm oranına sahip olan ve istikrarlı amplifikasyon veren primerler analizlerde yer almıştır. Bu şekilde sonuçların güvenilirliğinin daha da arttırılması sağlanmıştır. Çalışmada toplamda 80 DNA fragmenti elde edilmiştir, bunların 75'i polimorfik özellik göstermektedir. NTYSY pc 2.0 paket programı ile analiz edilen UPGMA metodu ile bitki materyalleri arasındaki genetik ilişkiyi ortaya koyan dendrogram elde edilmiştir. Bu dendrograma göre örnekler arasındaki genetik benzerlik oranı 0.59 ile 0.93 arasında değişmektedir. Dendrogramdaki ayrışmada 27 numaralı genotipin dışarıdan bağlanması dışında örneklerin temelde iki ana gruba ayrıldıkları görülmüştür. Aynı dendrogramda 30 ve 31 no'lu örnekler birbirlerine çok yakın mesafede olup birbirinden ayrılamadığı gözlenmiştir. Bu 30 ve 31 no'lu materyallerin genetik yakınlığı Minitab programı ile elde edilen Temel Bileşenler Analizi (PCoA) sonucunda da görülmüştür (Şekil 1; 2). PCoA analizinden anlaşıldığı üzere, kullanılan her iki eksende de örnekler birbirine o kadar yakındır ki hemen hemen üstüste çakışmışlardır. Halbuki pekçok durumda dendrogramın bazı zafiyetlerine bağlı olarak ayrışamayan örneklerin PCoA analizlerinde en az bir eksende farklılık gösterebildikleri bilinmektedir. Bu da gösteriyor ki, bu örnekler çok büyük olasılıkla aynı kaynaktan temin edilmiş, özellikleri aynı olan materyallere aittir. Yine de, daha fazla emin olmak için, daha çok sayıda primerle testleme veya farklı markör sistemlerinden de veri üretme faydalı olacaktır. Benzer şekilde, dendrogramda en üstteki dalı oluşturan 3, 4, 5 ve 26 numaralı birbiri ile ilişkili örnekler ele alındığında, bu örneklerin PCoA analizlerinde faklılıklar görülmüştür. PCoA analizinde 3, 4, 5 ve 13 numaralı örnekler ana grubun dışında bir çekirdek grup halinde yer almakta olup bu örnekler PCoA2 ekseninde

birbirlerine çok yakın mesafede yer almışlardır. Halbuki, üstte tartışılan 30 ve 31 numaralı örneklerin aksine, PCoA ayrım gücü PCoA1 ekseninde devreye girmiş ve bu örneklerin ayrı bir grubu oluşturmakla beraber birbirlerinden belli mesafede farklılıkları da açığa çıkmıştır. Dendrogramdaki grupta yer alan 26 numaralı örneğin ise ana grubun içine dahil olduğu gözlenmiştir. PCoA analizine göre ayrıca 25 ve 33 numaralı örneklerin ana grubun tamamen dışında olup belirgin bir farklılık taşıdıkları görülmüştür. Özellikle de 33 numaralı örnek tüm diğer örneklerden ayrışmıştır. Bu verilerin Dahlia ıslah programında kullanılacak değerli sonuçlar olabileceği değerlendirilmiştir.

Sonuç

Sonuç olarak, uygulanan analiz yöntemi ile genotipler birbirinden yeterli düzeyde ayrılmış olup genotipler için kullanılan primerlerin yeterince polimorfik oldukları ve ileride yapılabilecek ıslah çalışmaları için seçilecek olan örneklerin genetik altyapısı hakkında yeterli bilgiyi sağladığı görülmüştür.

Not: Bu çalışmada kullanılan bitki materyali için Bahar Banu Batı'nın tez materyalinden faydalanılmıştır.

Kaynaklar

Alp, Ş., 2008. Yıldızçiçeği (*Dahlia* ssp.). In: Bağbağçe, Vol. 17, Yüzüncü Yıl Üniversitesi. Van, 22-25.

Batı, B.B., Direk, M., Paksoy, M., 2014. Konya konaklarında bir güzel: Yıldız çiçeği. 10. Sebze Tarımı Sempozyumu, 2-4 Eylül 2014, Tekirdağ. Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü.

Direk, M. 2015. Konya Bahçelerinde Bir Güzel: Yıldız Çiçeği, Vol. 2015, Plant Dergi. Konya.

Dogan, B., Duran, A., Hakki, E.E., 2007. Phylogenetic analysis of Jurinea (Asteraceae) species from Turkey based on ISSR amplification. Annales Botanici Fennici, 44(5): 353-358.

Doyle, J. 1991. DNA Protocols for Plants. In: Hewitt, G., Johnston, A.B., Young, J.P., Molecular Techniques in Taxonomy, Vol. 57, Springer Berlin Heidelberg, 283-293.

Hakkı, E.E., Kayıs, S.A., Pınarkara, E., Sag, A., 2007. Inter simple sequence repeats separate efficiently hemp from marijuana (*Cannabis sativa* L.). Electronic J. Biotech., 10(4): 570-581.

Kayıs, S.A., Hakkı, E.E., Pınarkara, E., 2010. Comparison of effectiveness of ISSR and RAPD markers in genetic characterization of seized marijuana (*Cannabis sativa* L.) in Turkey. African J. Agric. Research, 5(21): 2925-2933.

Khan, M.K., Pandey, A., Thomas, G., Akkaya, M.S., Kayıs, S.A., Ozsensoy, Y., Hamurcu, M., Gezgin, S., Topal, A., Hakkı, E.E., 2015. Genetic diversity and population structure of wheat in India and Turkey. AoB Plants.

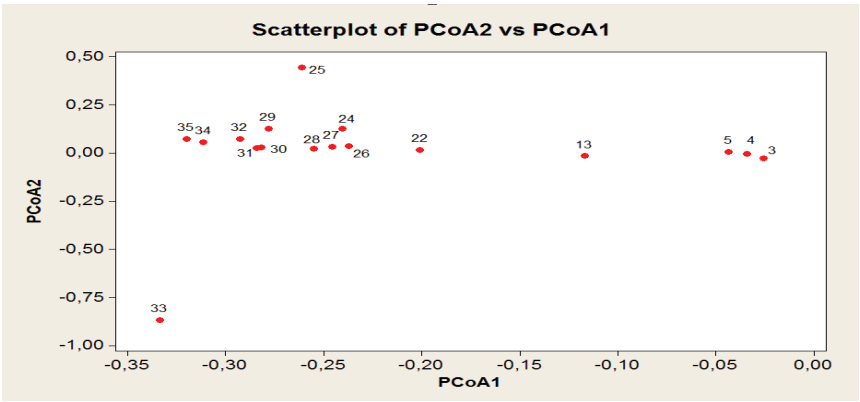
Ozturk, M., Duran, A., Hakkı, E.E., 2013. Cladistic and phylogenetic analyses of the genus Cicer in Turkey. Plant Systematics and Evolution, 299(10): 1955-1966.

Sorensen, P.D., 1970. The Dahlia: An early history. In: The Magazine of The Arnold Arboretum, Vol. 30, Arnold Arbetorum of Harvard University. Massachusetts, 121-138.

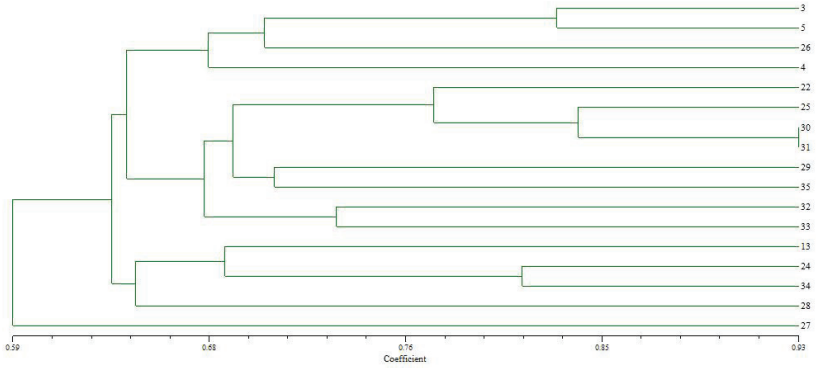
Wegner, H., Debener, T., 2008. Novel breeding strategies for ornamental Dahlias II: Molecular analyses of genetic distances between Dahlia cultivars and wild species. European Journal of Horticultural Science, 73(3): 97-103.

Çizelge 3. PCR reaksiyonlarında polimorfik DNA fragmenti üreten ISSR primerleri

Primer Adı	Primer Dizisi	Tm Değerleri (°C)	Toplam Band Sayısı	Polimorfik Band Sayısı	Polimorfizm Oranı	Bağlanma Sıcaklıkları
M15	$(CA)_8$ AG	53.7	3	1	33.3	52.0
F4	$(AG)_8$ TG	53.7	6	5	83.3	52.0
M5	$(GA)_9$ C	56.7	7	7	100.0	50.5
M9	$(AC)_8$ CG	56.0	10	10	100.0	50.0
M2	$(ACC)_6$ G	63.1	5	4	80.0	54.5
M3	$(AGC)_6$ C	63.1	10	10	100.0	54.5
F1	GAG $(CAA)_5$	49.1	8	8	100.0	44.1
M16	$(CA)_8$ GC	56.0	11	11	100.0	49.0
M7	$(AG)_9$ C	56.7	4	3	75.0	49.5
M8	$(AC)_9$ G	56.7	8	8	100.0	49.5
F3	$(AG)_8$ CG	56.0	8	8	100.0	49.5
			80	75	88.3	



Şekil-1. Yıldızçiçekleri genotiplerinden Minitab istatistik programı ile elde edilen iki boyutlu analiz sonucu



Şekil-2. Yıldızçiçekleri genotiplerinden NTYSYS-pc 2.0 istatistik programı ile elde edilen dendrogram