

TAEK-SAĞEL MUTANT NOHUT ÇEŞİTİNİN VERİM, KALİTE ÖZELLİKLERİ VE MOLEKÜLER TANIMLAMASI

Dr. Zafer SAĞEL¹, Dr. M.İhsan TUTLUER¹, Dr. Hayrettin PEŞKİRCİOĞLU¹,
Dr. Yaprak KANTOĞLU¹, Yeliz TÜMBİLEN¹, Dr. Burak KUNTER¹, Mustafa ÖZÇOBAN¹
¹Türkiye Atom Enerjisi Kurumu- Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi

1994 tarihinde TAEK-SANAEM’de başlatılan nohut mutasyon ıslahı projesi ile; adaptasyon kabiliyeti yüksek, nadas alanlarının azaltılmasına katkıda bulunabilecek, soğuğa ve kurağa dayanıklı, makineli hasada uygun, verimi ve protein oranı yüksek, iri taneli, hastalıklara özellikle antraknoza ve zararlılara dayanıklı, kaliteli mutant nohut çeşitlerinin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu proje sonucunda geliştirilen ve 2006 yılında tescil ettirilen TAEK-SAĞEL mutant nohut çeşidinin, farklı lokasyonlarından elde edilen verim, morfolojik ve kalite özellikleri belirlenmiştir. Bunun yanı sıra TAEK-SAĞEL mutant çeşidi ile birlikte üretimde kullanılan Sarı 98, Küsmen, Canitez, ILC 482, Gökçe, Dwelly, Eser 87, Akçin, Er 99, Uzunlu 99, Kırmızı nohut çeşitleri, Sağel 88, Ak 71114 ve Gökçe’den geliştirilen M₄ aşamasındaki 2 mutant hattın moleküler ayrımı için PCR bazlı SSR işaretleyicileri kullanılarak bunlar arasındaki farklılık ve akrabalık seviyesi saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Nohut, *Cicer arietinum* L., TAEK-Sağel, Mutasyon Islahı, Işınlama, SSR

YIELD, QUANTATIVE CHARACTERISTICS and MOLECULAR DETERMINATION of MUTANT TAEK-SAĞEL CULTIVAR

A mutation breeding programme was initiated at the Nuclear Agriculture Section of the Saraykoy Nuclear Research and Training Center in 1994 by which good quality chickpea mutants with higher adaptation ability, have a contribution to decreasing fallowing land, tolerant to cold and drought, increased machinery harvest type ability, high yielding and protein content, with large seeds, resistant to diseases especially to antracnose and pest, higher yield are aimed to be improved. By the end of the project, improved and officially registrated (2006) TAEK-SAĞEL mutant type was examined in different locations due to its yield, morphology and quality. Besides, for the molecular separation of chickpea types, which are breed together with TAEK-SAĞEL, Sarı 98, Küsmen, Canitez, ILC 482, Gökçe, Dwelly, Eser 87, Akçin, Er 99, Uzunlu 99, Kırmızı Nohut, Sağel 88, Ak 71114 and two mutant M₄ lines developed from Gökçe were determined in terms of diversity and relationship by PCR-based SSR markers.

Keywords: Chickpea, *Cicer arietinum* L., TAEK-Sağel, Mutation breeding, Nuclear techniques, SSR

1. GİRİŞ

Türkiye baklagiller açısından önemli gen merkezlerinden biridir ve nohut Türkiye için önem arz eden bir türdür. Nohut’un en çok bilinen özelliği insan ve hayvan beslenmesinde kullanılan önemli bitkisel protein kaynağı olmasıdır. Bununla beraber, geleneksel besin çeşidimiz olan buğdaya göre nohut 2-3 kat daha fazla protein içeriğine sahiptir. Bu türde yürütülen ıslaha yönelik çalışmalarda klasik ıslah programlarının yanı sıra mutasyon ıslahı da önemli bir diğer yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Mevcut gen havuzunun genişletilmesinde etkin bir yol olan mutasyon ıslahı çalışmalarının, bu potansiyeli dikkate alınarak, tarafımızdan nohut için yürütülen çalışma sonucunda geliştirilen mutant nohut hattının, farklı lokasyonlarda yürütülen denemeler sonucunda; verim, morfolojik ve kalite özellikleri belirlenerek üstün özellikleri ortaya konulmuş ve 2006 yılında TAEK-SAĞEL nohut çeşidi olarak tescil edilmiştir. Son 10 yıllık süre içinde elde edilen yeni çeşit ya da tiplerin farklılığını ortaya koymak amacıyla PCR bazlı işaretleme tekniklerinden (RAPD, SSR, AFLP, EST-SSR) yararlanılarak moleküler düzeyde çeşitler ya da tipler arası farklılık veya akrabalık düzeyleri belirlenmektedir [6, 7, 8, 9, 10]. Bu nedenle bu çalışmanın bir diğer bölümünde, mutant TAEK-SAĞEL çeşidinin diğer mevcut çeşitler (Sarı 98, Küsmen, Canitez, ILC 482, Gökçe, Dwelly, Eser 87, Akçin, Er 99, Uzunlu 99 ve Kırmızı nohut çeşitleri ile Sağel 88, Ak 71114, Gökçe’den geliştirilen M₄ aşamasındaki 2 mutant hat) ve başlangıç materyali arasındaki farklılığını ve akrabalık düzeyini belirlemek amacıyla SSR işaretleyicileri kullanılarak bunlar arasındaki ayrım moleküler düzeyde saptanmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmada başlangıç materyali olarak ILC 482, AK 71114 ve AKÇİN 91 nohut çeşitleri kullanılmıştır. Tohumlar 13 Nisan 1994 tarihinde Kobalt-60 (⁶⁰Co) kaynağında 0, 50, 100, 150, 200,

250, 300, 350 ve 400 Gy'lik dozlarda ışınlanmıştır [1]. Tescil çalışmaları Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü, Tohumluk Tescil ve Sertifikasyon Merkezi Müdürlüğü'nce yapılmıştır. Denemelerde daha önceki yıllarda tescil edilen 4 standart çeşit kullanılmış ve denemeler 2004-2005 yılları arasında, Ankara, Esenboğa, Haymana, Konya ve Eskişehir lokasyonlarında tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Moleküler düzeyde ise elde edilen mutantlar ve diğer standart çeşitler arasındaki ayrımı belirlemek amacıyla SSR işaretleyicileri kullanılmıştır. Bu amaçla her çeşit ve mutant için 4 tekerrürlü olarak her saksıya 5 adet tohum ekilmiştir. Elde edilen bitkilerden dörder adet yaprak örneği alınarak bunlardan DNA ekstraksiyonu Varma et al [4]'e göre yapılmıştır. Nohut yapraklarında bulunan polisakaritler nedeniyle ortaya çıkan jelimsi DNA yapısından dolayı yöntem Chakraborti et al. [5]'ün protokolünden de yararlanılarak modifiye edilmiştir. Moleküler düzeyde çeşitliliğin belirlenebilmesi amacıyla 30 adet SSR [8] işaretleyicisi seçilerek kullanılmıştır (Çizelge 2.1). Uygun PCR kokteyli ve profili de [8] kendi şartlarımıza adapte edilmiş ve PCR profili olarak 94°C 3 dk, 35 döngü için 94°C 20 sn, 50°C 30 sn ve 65°C 50 sn, ve 72°C 5 dakikalık bir program uygulanmıştır. PCR karışımının bileşenleri ise Lichtenzweig et al. [8]'dan 15 µl'lik reaksiyon için modifiye edilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri %4 agaroz jelde 90-120 Volt'ta yürütülmüş ve etidium bromide ile boyanarak, UV translüminatörde görüntülenerek skorlanmıştır. Skorlama sonrasında elde edilen veriler NTSYS-2.2j paket programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan primerler ve sekansları [8]

Primer Kodu	Sekanslar	Primer Kodu	Sekanslar	Primer Kodu	Sekanslar
1	H1A06 TGGATAATTGTAGGGTAAGAAATGC TGTGTAATTTAAGTGTGGGGTATT	11	H3D09 GGCAAATCTCTCCATAAGAGG CACACTTTAGCACAAATGCAGAA	21	H1B09 GGTTTCATGACCTGCACCTA AAGAACCAGAAAACACTGTGA
2	H1A12 CGAGCCTCACTTAACCATG CGATGATAACTCGATTTCCTTT	12	H3G06 AATTCAAGGACGAATTTTATAACG GGAAGGAAAAATGAATTAATAATGA	22	H1E12 TGACATTTGACGTTTGTGCT ACCCCAATAGCGAAATTTGAC
3	H1F14 GAGAGAGAGGAAGGGAAAACG CCCTAAGCTTGTCTCTTAACCTTG	13	H4A04 GCAAATTTCTCACCTTTCTTTT TGTTTGACGCAATGAGAAGTAAAGA	23	H1H11 TGATTTTTGTCTGGAATCAAT TCAACCAGACAAAATCTACCTGA
4	H1G16 GTTTGTCTTCAACACCGAGA CCATGAAAGCCCTGAATTAT	14	H4G05 TGCTAAACTATCTCTGACCTTTTG AAAAATGCTATTACTGGATAAACACAA	24	H1I20 CCGTCAACAATGGCATAACAT TCAACCATTTCTTCCTCTCTT
5	H1H07 CATCAAATAATGATGTGCTTGC AAATTTGTTGATTTTAACTAACCAAGA	15	H4G08 AAATGAAAATGGGTTTAGGAA CGTCTTTGACTTGAAGGATTT	25	H2A04 GATTTTCTTGAAAACAACATATAGTCA VTGTGTGGAGGTTTGTGA
6	H1O10 TGGTTTTTCAAGAATGCAA TTTTGGATGATGAATAAAGGAA	16	H4H07 TCTTACGTATTTTACTTTGATCTCA CTGAAAACACTGTGATTTGTTAAAAG	26	H2J04 GGTGTGTGATAAAATTTGTGATGA GCCTATGGTACTCCATTAAGACCT
7	H1P17 TGCCCTCCACTTACATTAGG TTGCACGAAGACCAATTAGAA	17	H5D02 TCAATTTAACTTGGCCCACTAAC AAGGTTTGTGGTGTGAAGAACT	27	H4F09 TCATCGACTGTATTGGAGGAAAA GCACCTTCAGTTTGAATTGTGT
8	H1K18 GATGAGCCCAAGCTCCAA CAAACAAAACAGAGGATGTTGA	18	H5E05 AAAAAGCTCTAGAGGGGAGAG AATGATATCTTTTTAAACAGAAAG	28	H4H06 CACACAGCTCCAACAGATTG ATGTGCAACTTCAACCACCTAT
9	H2I20 TGTTTTCTCATCTGTTAAATCAA AGCATGCCCTGTGATGAATAGTAAC	19	H6B11 AGCTCCATATCTGAGGCTTT TCACTGTATCGGAGTTCTACTGC	29	H4A09 ATTACAGAGCAAAATGACCTCA TAATACTCTCCCAATCCCAAA
10	H3B04 TGTTCCTGTGTTGAGAACTC TATTTATGATATCCCGGTGAC	20	H6D02 CTTCCGAATATGGACTTGGTT CATAAATCTAAGTTACGGGTCTGTT	30	H1O01 GCCCTTCTGCCATAAGATT AGCCCGTAAGTGTATCCAA

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1. Tescil denemeleri

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü, Tohumluk Tescil ve Sertifikasyon Merkezi Müdürlüğünce 2 yıl (2004-2005) süre ile Ankara, Konya ve Eskişehir lokasyonlarında yapılan tescil denemeleri sonucunda (Çizelge 3.1.1), TAEK-SAĞEL ve TAEK-SAĞEL-10 mutant hattının ortalama verimi 186 kg/da olarak belirlenmiştir. TAEK Sağel mutant hattının yapılan kalite analizleri sonucunda, protein oranı %23.2, kuru ağırlığı 41 g, yaş ağırlığı 85 g, su alma kapasitesi 45 g/tohum, su alma indeksi %1.15, kuru hacim 81 ml, şişme kapasitesi 0.47 ml/tohum, şişme indeksi %2.52 ve pişme süresi 37 dakika olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1.2). TAEK-SAĞEL mutant hattının farklı lokasyonlarda, 171.2 kg verim değeri ile en düşük hata kareler ortalamasına sahip en stabil çeşit olduğu ve her koşulda en yüksek verim kapasitesine sahip olduğu belirlenmiş ve TAEK-SAĞEL adı ile 12 Nisan 2006 tarihinde TAEK adına tescil edilmiş ve 12 Ağustos 2006 tarihli ve 26257 sayılı Resmi Gazete de yayınlanarak milli çeşit listesinde yerini almış ve Türk tarımının hizmetine sunulmuştur

Çizelge 3.1.1. Nohut Tescil Denemeleri Verim Sonuçları (2004-2005)

Çeşit/Hat	Ankara 2004	Esenboğa 2005	Haymana 2005	Konya		Eskişehir		Verim kg/da
				2004	2005	2004	2005	
TAEK SAĞEL	213,3	196,7	204,6	166,9	154,9	212,2	154,5	186,7
TAEK SAĞEL-10	200,6	194,7	249,8	170,1	149,3	213,3	125,2	186,2
AKN 291	157,4	157,4	197,3	145,8	108,4	167,6	94,9	147,0
Uzunlu 99 (st)	163,2	118,7	136,0	102,4	92,4	163,4	108,1	126,3
Gökçe (st)	213,4	199,0	168,2	167,7	125,6	189,4	156,5	174,3
Akçin 91 (st)	179,2	173,1	275,9	137,8	115,4	160,6	132,9	167,8
Camitez 87 (st)	200,2	159,3	203,9	89,2	115,8	183,3	159,7	158,8
	F	**		CV(%)	10,7		LSD	93

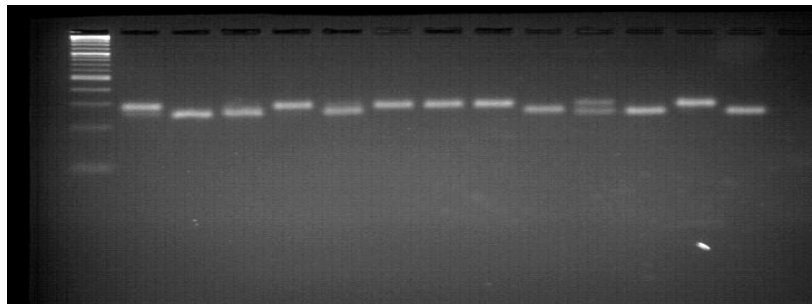
Çizelge 3.1.2. 2005 Yılı Eskişehir Nohut Verim Denemesi Kalite Analizi Sonuçları

Çeşit / Hat	K.A (g)	Y.A (g)	S.A.K (g/tane)	S.A.İ (%)	K.H (ml)	I.H (ml)	Ş.K (g/tane)	Ş.İ (%)	P.S (dak)
TAEK SAĞEL	41	85	0.45	1.15	81	178	0.47	2.52	37
TAEK SAĞEL-10	43	90	0.47	1.13	82	181	0.49	2.53	48
AKN 291	46	99	0.53	1.14	86	189	0.53	2.47	48
Uzunlu 99 (st)	43	91	0.48	1.16	82	182	0.50	2.56	45
Gökçe (st)	40	84	0.44	1.09	81	175	0.44	2.42	54
Akçin 91 (st)	44	91	0.47	1.11	83	182	0.49	2.48	53
Canitez 87 (st)	47	97	0.50	1.04	86	185	0.49	2.36	55

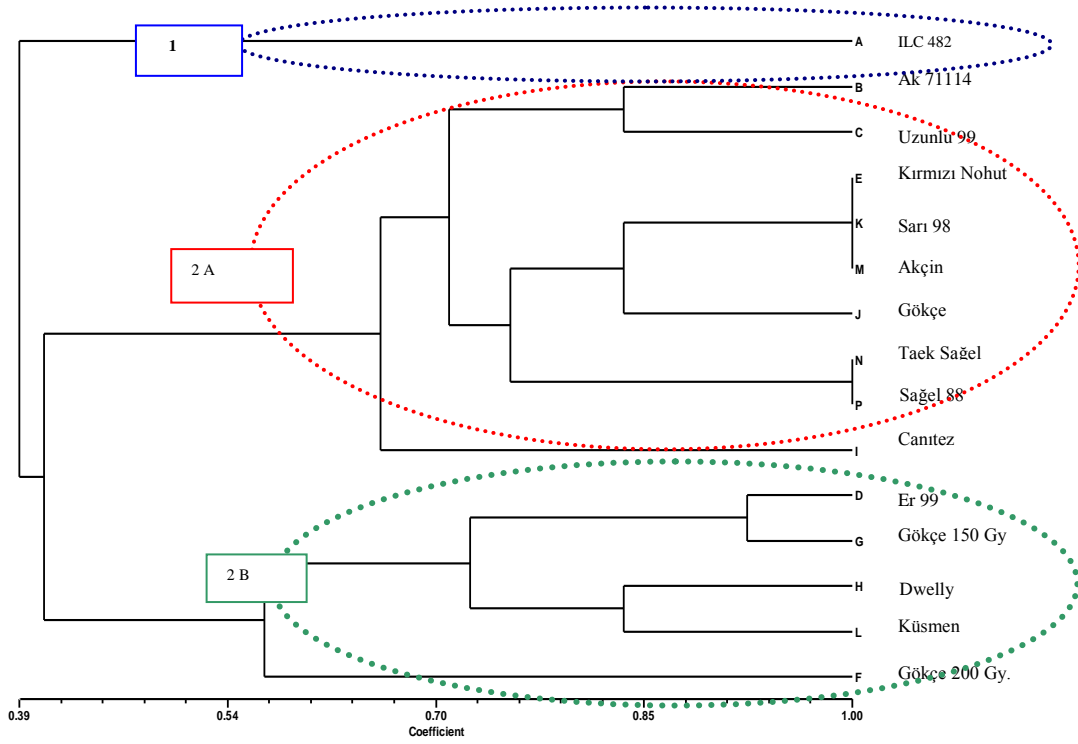
K.A: Kuru Ağırlık, Y.A: Yaş Ağırlık, S.A.K: Su Alma Kapasitesi, S.A.İ: Su Alma İndeksi, K.H: Kuru Hacim, I.H: Islak Hacim, Ş.İ: Şişme Kapasitesi, Ş.İ: Şişme İndeksi, P.S: Pişirme Süresi

3.2. Moloküler Karakterizasyon Çalışmaları

Moleküler karakterizasyon çalışmalarında, toplam 30 SSR işaretleyicisi ile yapılan jel çalışmaları neticesinde; bu işaretleyicilerden 13 tanesinde polimorfik bantlanma izlenirken, 7 tanesinde verimli sonuç alınmamıştır. Geriye kalan diğer 10 adet işaretleyici ile çalışılan örneklerde ise polimorfizm tespit edilmemiştir. Elde edilen bantlar 1-0 şeklinde skorlanarak (Şekil 3.2.1), sonuçlar ağaç analizleri için NTSYS-2.2j paket programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Ağacın çizilmesinde korelasyon katsayısı Dice [11] metoduyla belirlenmiş ve kümelemenin verim oranı Mantel [12] metodundan yararlanılarak $r = 0.83898$ olarak hesaplanmıştır. Bu değer, örnekler ile ağaç arasındaki korelasyonu belirtirken, istatistiksel olarak da iyi bir uyumun var olduğu şeklinde ifade edilmiştir [13]. Nohut örneklerinden elde edilen dendrograma göre, çeşitler 0.39'lük katsayı ile iki büyük gruba ayrılmaktadır (Şekil 3.2.2). Buna göre bir grup tek bir bireyle temsil edilirken (ILC 482), diğer grup kalan tüm bireyleri kapsamaktadır. İkinci grup da kendi arasında 0.41 lik bir katsayı ile iki büyük gruba ayrılmıştır (Şekil 3.2.2). İkinci grubun ilk grubu (2A), 0.66'lık bir benzerlik oranı gösterirken, ikinci grup (2B) 0.57'lik bir benzerlik göstermektedir. Elde edilen dendogramda mutant TAEK-SAĞEL bireyi 2A grubunda yer alarak, SAĞEL 88 ile tam benzerlik sergilemiştir (Şekil 3.2.2). Yine 2A grubunda bulunan Kırmızı Nohut, Sarı 98 ve Akçin'de tam benzerlik göstererek gruplandırmada yerini almıştır. Bu verilere göre her iki durumda da analize alınacak farklı çeşit ve kullanılacak işaretleyici sayısının artırılması ile daha detaylı bir ayırım sonucuna ulaşılabileceği kanaati çalışma sonucunda ağırlık kazanmıştır. Bununla beraber, elde edilen dendrograma göre Kırmızı Nohut, Sarı 98 ve Akçin çeşitlerinin yüksek oranda benzerlik sergilediği ve aynı benzerliğin mutant TAEK-SAĞEL ve SAĞEL 88 için de geçerli olduğu görülmüştür. Elde edilen verilere göre, menşei farklı olan ILC 482, analize alınan diğer tüm nohutlardan ayrılmıştır. Bunun yanında farklı dozlarda ışınlanmış Gökçe örnekleri ile ışınlanmamış Gökçe arasında genetik olarak mevcut olan farklılık yapılan analizler sonucunda ortaya konulmuştur. Şekil 3.2.1'den de izlendiği gibi her birinin ayrı gruplarda yer aldığı belirlenmiştir. Bunun sonucunda, mutasyon ile elde edilen farklılık moleküler düzeyde de teyit edilmiştir. Ayrıca morfolojik özelliklerindeki benzerlikleri de göz önüne alındığında elde edilen gruplandırmaların klasik sistematiğe de uyum gösterdiği saptanmıştır. Yapılan bu çalışma ile, mutantların gerek başlangıç materyali ile gerekse diğer çeşitlerle olan farklılığının belirlenmesinde moleküler işaretleyicilerin etkin bir şekilde kolaylıkla ortaya konularak geleceğe yönelik olarak planlanacak olan çalışmalarda daha fazla sayıda ve farklı tipte olan işaretleyici kullanımının daha detaylı verilere ulaşmamızı sağlayacağı belirlenmiştir.



Şekil 3.2.1. H4A04 kodlu SSR primerine ait agaroz jelden elde edilen görüntü



Şekil 3.2.2. Üretimde kullanılan nohut çeşitleri ve mutant nohutların moleküler seviyedeki benzerlikleri ve gruplandırma seviyeleri

4. KAYNAKLAR

- [1] CONSTANTİN, M.J., KLOBE, W.D. and SKOLD, L.N., 1976. Effects Of Physical and Chemical Mutagens on Survival, Growth and Seed Yield of Soybean. *Crop. Sci.* Vol.16. p.49-52.
- [2] DÜZGÜNEŞ, O., 1963. Bilimsel Araştırmalarda İstatistik, Ege Üniv. Yayınları, İzmir, 375 p.
- [3] WILLIAMS, P., EL-HARAMEIN, F.J., NAKKOUL, H., RIHAAWI, S., Crop Quality Evaluation Methods and Guidelines. ICARDA, April, 1986 p.142.
- [4] VARMA, A., PADH, H., SHRIVASTAVA, N. 2007. Plant Genomic DNA Isolation: An Art or Science. *Biotechnology Journal* 2, p.386-392.
- [5] CHAKRABORTI, D., SARKAR, A., GUPTA, S., DAS, S. 2006. Small and Large Scale Genomic DNA Isolation Protocol for Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Suitable for Molecular Marker and Transgenic Analyses. *African Journal of Biotechnology* Vol.5(8), pp585-589.
- [6] TALEBİ, R.F., FAYAZ, M., MARDI, S.M., NAJİ, A.M. 2008. Genetic Relationships Among Chickpea (*Cicer arietinum*) Elite Lines Based on RAPD and Agronomic Markers. *Int. J. Agri. Biol.*, 10:301-5
- [7] CHOUDHARY, S., SETHY, K.N., SHOKEEN, B., BHATIA, S. 2009. Development of Chickpea EST-SSR Markers and Analysis of Allelic Variation Across Related Species. *Theor. Appl. Genet.* 118:591-608pp
- [8] LICHTENZVEIG, J., SCHEURING, C., DODGE, J., ABBO, S. 2005. Construction of BAC and BIBAC Libraries and Their Applications for Generation of SSR Markers for Genome Analysis of Chickpea, *Cicer arietinum*. *Theor. Appl. Genet.* 110:492-510pp.
- [9] SHAN, F., CLARKE, H:C., PLUMMER, J:A., YAN, G., SIDDIQUE, K.H.M. 2005. Geographical Patterns of Genetic Variation in The World Collections of Wild Annual *Cicer* Characterized by Amplified Fragment Length polymorphism. *Theor. Appl. Genet.* 110:381-391pp.
- [10] SUDUPAK, M.A., AKKAYA, M.S., KENCE, A. 2004. Genetic Relationships Among Perennial and Annual *Cicer* Species Growing in Turkey Assessed by AFLP Fingerprinting. *Theor. Appl. Genet.* 108:937-944pp.
- [11] DICE, L.R. 1945. Measures of the amount of the ecological association between species. *Ecology* Vol.26, 297-302pp.
- [12] MANTEL, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* Vol.27, 209-220pp.
- [13] MOHAMMADI, S.A. and PRASANNA, B.M. 2003. Analysis of genetic diversity in Crop Plants-Salient Statistical Tools and Considerations. *Crop Sci.* Vol.43, 1235-1248pp.