

Konya Bölgesinden Toplanan *Phaseolus vulgaris* (Leguminosae) Populasyonları Arasındaki Genetik Çeşitliliğin SDS-PAGE Yöntemi ile Belirlenmesi

Elif GÜLBAHÇE, Buğra ÖZKUBAT, Emine ARSLAN*

Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Konya

Özet: Bu çalışmada Konya'nın ilçelerinden toplanan 17 *Phaseolus vulgaris* populasyonu arasındaki genetik çeşitliliğin SDS-PAGE ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Tohum depo protein profilleri görsel şekilde var (1) ya da yok (0) olarak skorlanmıştır. On yedi *Phaseolus vulgaris* populasyonunda, 14.4 ve ~135 kDa arasında değişen farklı büyüklüklerde toplamda 37 polipeptit bant gözlenmiştir. Bio1D++ bilgisayar programında UPGMA kullanılarak kümeleme analizi yapılmıştır. Genotipler arasındaki benzerlik Nei'nin homolojisine dayanarak tahmin edilmiş ve bir dendrogram elde edilmiştir. Dendrograma göre *Phaseolus vulgaris*'e ait 17 populasyon %68-100 arasında değişen oranlarda benzer bulunmuştur. En yüksek benzerlik Kanada (Çumra) ve Sarnıç (Altınekin) genotipleri arasında bulunurken, en uzak genotip Sarhoş (Washington) (Derbent) olmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Phaseolus vulgaris*, Genetik çeşitlilik, SDS-PAGE, Tohum depo protein

Determination of Genetic Diversity among *Phaseolus vulgaris* (Leguminosae) Populations Collected from Konya Region by SDS-PAGE

Abstract: This study aimed to determine the genetic diversity among 17 *Phaseolus vulgaris* populations collected from districts of Konya by SDS-PAGE. Seed storage protein profiles were scored visually as present (1) or absent (0). In all, 37 polypeptide bands of different sizes ranging from 14.4 to ~135 kDa were observed in the 17 *Phaseolus vulgaris* populations. Cluster analysis was performed using the UPGMA in Bio 1 D ++ computer program. Similarity among genotypes was estimated basing on Nei's homology and a dendrogram was obtained. According to dendrogram, 17 populations belonging to *Phaseolus vulgaris* were similar in rates ranging from 68 to 100 %. While the highest similarity was found between Kanada (Çumra) and Sarnıç (Altınekin) genotypes, the most distant genotype was Sarhoş (Washington) (Derbent).

Key Words: *Phaseolus vulgaris*, Genetic diversity, SDS-PAGE, Seed storage protein

Giriş

Türkiye'nin en çok tür içeren ve ekonomik değer taşıyan familyalarından birisi olan Leguminosae (Fabaceae) Dünyada 650 cins ve 18.000 türle temsil edilmektedir [1] 406 tür endemiktir [2]. Bu familyaya ait olan *Phaseolus* cinsinin Türkiye'de 230'a yakın türü bulunmaktadır, fakat bunlardan 20 kadarı ekonomik öneme sahiptir [3, 4].

Türkiye'de kuru fasulye, ekim alanı ve üretim yönünden nohut ve mercimekten sonra üçüncü sırada yer almaktadır. Günümüzde fasulye kuru tane üretimi 225 000 ton dolaylarındadır. Ekim alanları en çok Karadeniz bölgesinde yaygın olup, bunu orta güney (Kayseri, Konya, Niğde, Nevşehir) ve orta kuzey (Eskişehir, Kütahya, Uşak, Yozgat) bölgeleri izlemektedir [5].

Son yıllarda birçok üründe olduğu gibi kuru fasulyede de ıslah çalışmaları ve yeni geliştirilen çeşit sayıları artmıştır. Bitki ıslahı, bitkilerin biyolojik ve genetik açıdan disipline

* earslan@selcuk.edu.tr

edilmesi ve mevcut genetik farklılıklardan yararlanarak, onları istenilen amaçlar doğrultusunda geliştirmektir. Bitki ıslahı sayesinde kültürü yapılan bitkilerin verimliliklerini arttırmak, ürün kalitesini düzeltmek mümkündür [6]. Ancak tüketici çeşitliliğine bağlı olarak artan farklı talepler, yaşam kültürünün de artmasıyla daha dengeli ve sağlıklı beslenme istekleri, ülkenin ekolojik farklılıklarının bolluğu, tarımdaki gelişmeye bağlı olarak meydana gelen hastalık zararlıların yoğunlukları gibi sebepler, mevcutlarla yetinmeyip sürekli yeni çeşitlerin geliştirilmesini gerekli kılmaktadır [7].

Bitki ıslahının en verimli hale getirilmesi için doğru yöntemin seçilmesi gerekmektedir. Bunlardan biri olan proteomik analizler, bitki türlerini ve nesillerini tanımlamak ve kompleks karışımlarda proteinlerin belirlenmesi için en güçlü metod olmuştur [8]. Son zamanlarda, tohum protein elektroforezi sistematik akrabalıkların çözümünde ve özellikle tahıl ve Leguminosae gibi üretilen bitkilerin kültür çeşitliliğinin karakterize edilmesinde kolaylığı ve geçerliliği nedeniyle yaygın uygulama alanına sahiptir [1-3, 6, 9-13]. Bu metodunun yüksek çözünürlük sağlaması, tekrarlanabilirliği ve elektroforegramlarda proteinlerin molekül ağırlıklarına göre hareket etmesinden dolayı üstün olduğu bildirilmiştir [14].

Bu çalışmada, ıslah çalışmalarında çeşit geliştirmede faydalı olabilmesi için Konya Bölgesinden toplanan 17 *Phaseolus vulgaris* populasyonu arasındaki genetik çeşitliliği ve genetik akrabalığı tohum depo proteinlerinin SDS-PAGE yöntemi ile belirlemek amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal

Konya ilinde tarla tarımı şeklinde geniş alanlarda tarımı yapılan bodur kuru fasulye populasyonları ilçe, merkez ve köy bazında gezilerek toplanmıştır. Ayrıca daha önceden S.Ü. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nde bulunan tescilli çeşit olan Akman-98'de kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan materyallerin toplandığı lokaliteler Tablo1'de verilmiştir.

Tablo1. Çalışmada kullanılan materyallerin yöresel isimleri ve toplandığı lokaliteler (^TTescilli Çeşit).

Örnek numarası	Yöresel ismi	Toplandığı yer
1	Sarıköz	Başarakavak Kasabası
2	Kanada	Başarakavak Kasabası
3	Horoz	Çumra (Merkez)
4	Beyşehir Çalısı	Çumra (Merkez)
5	Kanada	Çumra (Merkez)
6	Sarıköz	Altinekin (Merkez)
7	Amerikan Çalısı	Altinekin (Mantar Köyü)
8	Dermason	Ereğli (Merkez)
9	Weihing	Kadınhanı (Merkez)
10	Kanada	Kadınhanı (Merkez)
11 ^T	Akman – 98	Kadınhanı (Merkez)
12	Sarhoş (Washington)	Derbent (Merkez)
13	Şeker	Derbent (Merkez)
14	Sıra	Seydişehir (Merkez)
15	Beyaz Horoz	İlgın (Beykonak Köyü)
16	Horoz (Kırk Günlük)	İlgın (Merkez)
17	Kanada	Yunak (Merkez)

Metot

Protein izolasyonu: Protein izolasyonu Saraswati ve ark. [15]'nin metodu modifiye edilerek yapılmıştır. Tohumlar havan da ezilerek toz haline getirilmiştir. Üzerine ekstraksiyon tamponu (0.5M Tris-HCl, 2.5% SDS, 10% gliserol ve 5% 2-merkaptotanol) ilave edilerek vortekslenmiştir. Daha sonra 5 dk kaynatılmıştır ve 5 dk 10000 rpm' de santrifüj edilerek süpernatant yeni bir tüpe alınmıştır.

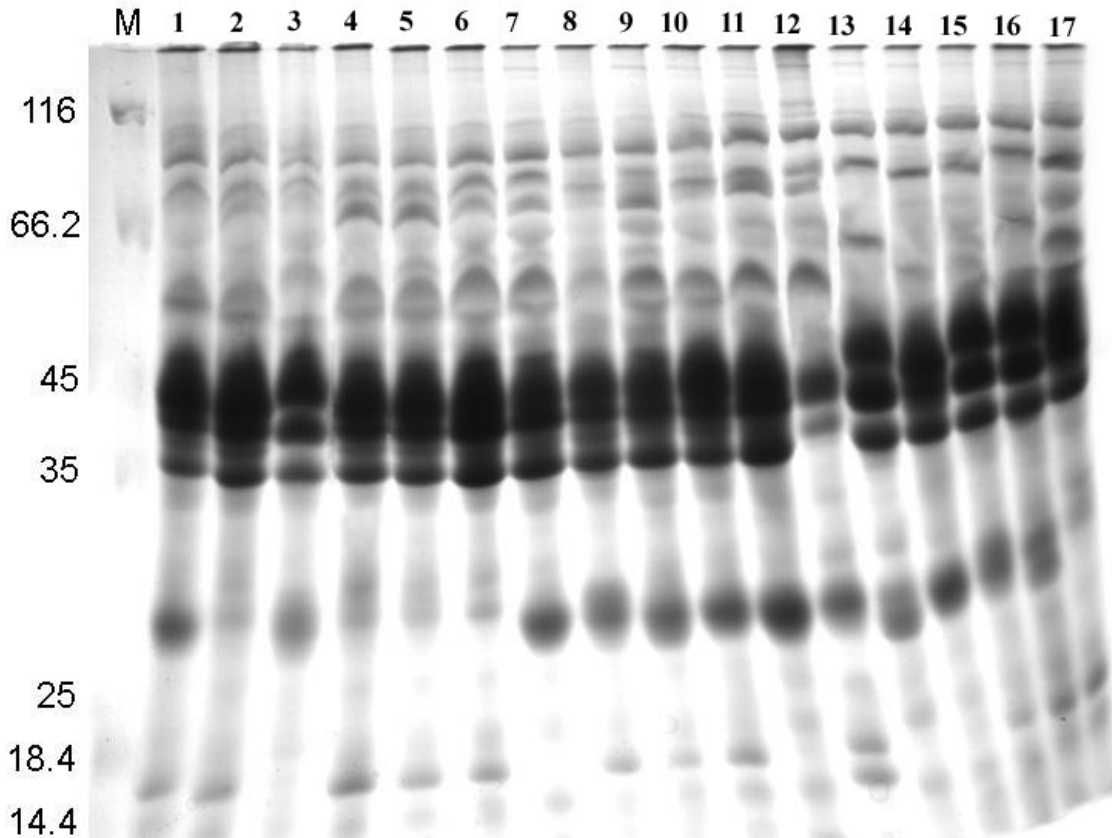
SDS-PAGE: SDS-PAGE dikey elektroforezde standart metod kullanılarak yapılmıştır. Tohum proteinleri %10' luk poliakrilamid jelde yürütülerek jel Coomassie Brilliant Blue G-250 M ile boyanmıştır. Markır proteinler (Fermentas- SM0431 Unstained Protein Molecular Weight Marker) referans olarak kullanılmıştır [16].

Data analiz: 17 *Phaseolus vulgaris* populasyonuna ait tohum depo proteinlerindeki polimorfik bantlar görsel olarak varlığına (1) ya da yokluğuna (0) göre skorlanmıştır. Populasyonlar arasındaki genetik benzerlik Bio1D++ bilgisayar programı kullanılarak Nei'nin homolojisine göre hesaplanmıştır. Kümeleme analizi aritmetik ortalamalı ağırlıksız çift grup yöntemi (UPGMA) ile yapılmıştır [17].

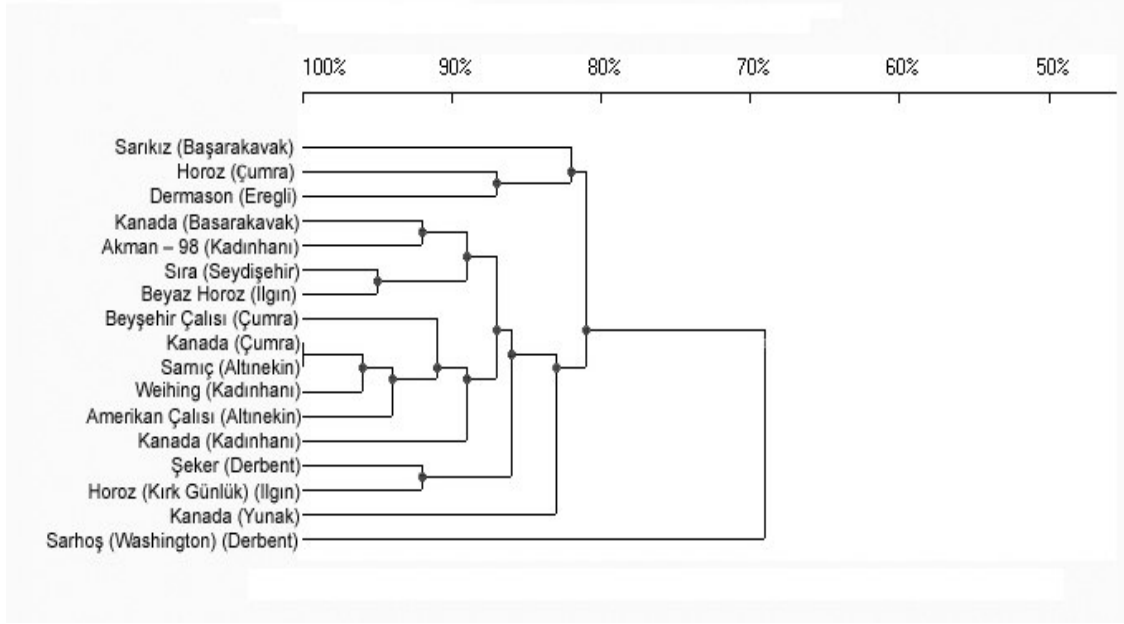
Sonuçlar ve Tartışma

Konya Bölgesinden toplanan 17 *Phaseolus vulgaris* populasyonu arasındaki genetik çeşitliliği ve akrabalığı belirlemek amacıyla yapılan bu çalışmada tohum depo proteinleri SDS-PAGE yöntemi ile analiz edilmiştir.

14,4 kDa dan ~135 kDa' a kadar değişen farklı büyüklüklerde 37 polipeptit bant gözlenmiştir. 17 *Phaseolus vulgaris* populasyonunda %68-%100 arasında bir genetik benzerlik bulunmuştur. En yüksek benzerlik (%100) Çumra populasyonundan elde edilen Kanada ile Altinekin populasyonundan elde edilen Sarnıç genotipleri arasında iken, en düşük benzerlik Derbent populasyonundan Sarhoş (Washington) (%68) genotipinde görülmüştür. Bu genotipe ait polimorfik bantlar 40-45 kDa ve 116~135 kDa arasındaki büyüklüklerde gözlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. SDS-PAGE ile elde edilen 17 *Phaseolus vulgaris* populasyonuna ait genotiplerin tohum depo protein profilleri.



Şekil 2. 17 *Phaseolus vulgaris* populasyonuna ait genotiplerin tohum depo protein profillerinin kümeleme analizine ait dendrogram

SDS-PAGE sonuçlarına göre 17 *Phaseolus vulgaris* populasyonuna ait genotipler tohum depo proteinlerinin kümeleme analizi Bio1D ++ bilgisayar programı kullanılarak yapılmıştır (Şekil 2). Bu program ile elde edilen dendrograma göre iki ana grup oluşmuştur. Birinci grupta %80-%100 arasında benzerlik gösteren fasulye genotipleri bulunurken ikinci grupta bunlara %68 uzaklıkta olan ve tohum morfolojisi de oldukça farklı olan Derbent populasyonundan Sarhoş (Washington) genotipi yer almaktadır.

Elde ettiğimiz protein profili sonucuna göre tüm fasulye genotipleri aynı majör bantlara sahipken minör bantları bakımından farklılıklar göstermektedir. Bu sebeple, polimorfizm oranı düşük olmasına rağmen minör bantlar genotipleri ayırmayı başarmıştır.

Phaseolus vulgaris genotipleri arasındaki genetik çeşitliliğin SDS-PAGE ile belirlenmesi çalışmaları oldukça kısıtlıdır. Sammour ve ark (2007) beş farklı *Phaseolus* türüne ait 11 genotip çalışmışlardır [18]. Molekül ağırlıkları 110 ile 15 kDa arasında değişen büyüklüklerde toplam 32 bant bulmuşlardır. Bu çalışma ile uyumlu olarak tür içinde SDS-PAGE profillerinin oldukça homojenlik gösterdiğini savunmuşlardır. Her bir türün ayrı ayrı kümelendiğini, *P. vulgaris*'in diğer türlere en uzak tür olduğunu tespit etmişlerdir.

Martins ve ark. [19], 17 *Phaseolus vulgaris* L. populasyonundaki genetik benzerliği RAPD-PCR ile belirlemiş ve bu benzerliği %56-70,5 oranları arasında bulurlarken, Svetleva ve ark. [20], 78 *Phaseolus vulgaris* L. populasyonunda ISSR ve AFLP yöntemleri ile %89 ile %100 arasında yakınlık bulmuşlardır. Aynı şekilde Mesoamerika'dan elde edilen yabani ve evcil tipte olan *Phaseolus vulgaris*' in genetik çeşitliliğin farklı coğrafi yapısının ve gen akışının asimetrisini incelenmesi amacıyla yapılan çalışmada evcil fasulye populasyonunun genetik çeşitliliği yabani populasyonla karşılaştırıldığında düşük seviyede olduğunu belirtmiştir [21]. Bizim elde ettiğimiz genetik akrabalık oranı bu araştırmacılarla uyum gösterirken, Lioi ve ark. [22], İtalya'da 33 lokal populasyonda SSR ile elde etikleri yüksek derecedeki heterojenite ile uyum göstermemektedir. Aynı şekilde bu çalışmanın aksine diğer bir grup araştırmacı da *Phaseolus vulgaris* kültürleri arasında genetik çeşitliliğin ve polimorfizmin yüksek olduğunu savunmuşlardır [23, 24].

Sonuç olarak polimorfizm derecesi düşük olan çalışmalara rastlanıldığı gibi genetik çeşitliliği yüksek çalışmalarda mevcuttur. Bizim populasyonlarımız bir türe ait populasyonlar arasında olması beklenen oranlarda akraba bulunmuşlardır. Fakat toplandıkları coğrafi bölgelerle genetik akrabalığı uyum göstermemektedir. Bunun nedeni, isimlendirme olarak birbirinden farklı olan ve % 100 benzerlik gösteren Çumra populasyonunun Kanada genotipi ve

Altınekin populasyonunun Sarnıç genotipi Konya'nın merkez, ilçe ve köylerindeki çiftçilerin verdiği isimler dikkate alınarak populasyonlar oluşturulmuştur. Bu sebeple, aynı ya da benzer populasyonlar farklı yörelerde farklı isimlerle adlandırılmış olabilir. Genetik olarak birbirine yakın populasyonların farklı çevre şartları ya da farklı yetiştirme şartlarından etkilenip morfolojik ya da fizyolojik olarak birbirinden farklılık göstermesi olasıdır.

Tohum depo proteinleri tür içi ve türler arası genetik çeşitliliğin analizinde, genetik kaynakların korunması ve ıslah çalışmalarında, genom ilişkilerinin belirlenmesinde, mahsullerin geliştirilmesinde genetik işaretleyici olarak başarılı bir şekilde uygulanmaktadır [5]. Bunun yanı sıra DNA'ya dayalı moleküler yöntemlerde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Çalıştığımız türün populasyonları arasındaki genetik çeşitliliğin belirlenmesi için SDS-PAGE yöntemine ilaveten SSR ve AFLP gibi moleküler tekniklerle de desteklenmesinin daha güvenilir sonuçlar vereceği kanaatindeyiz.

Teşekkür

Tohumların elde edilmesinde bize yardımcı olan Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla bitkileri koleksiyonuna teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- [1] Babaoğlu, S., Açık, L., Çelebi, A., Adıgüzel, N. **Molecular Analysis Of Turkish *Alyssum L.* (Brassicaceae) Species By Rapid-Pcr And Sds-Page Methods.** G.U. Journal of Science 17(3):25-33, (2004).
- [2] Beyazbenli, Ş., Dural, H., Arslan, E., Ertuğrul, K. **Konya Bölgesindeki bazı *Vicia L.* (Leguminosae) Türlerinin Tohum Protein Profillerinin SDS-PAGE Yöntemiyle İle Belirlenmesi.** S.Ü. Fen Edebiyat Fak. Fen Dergisi, 28: 117-122, (2006).
- [3] Chen L.F.O., Cheng M.C., Chen S.C.G. **Similarity and diveristy of seed proteins in rice varieties.** Botanical Bulletin of Academia Sinica, 28: 169–183, (1987).
- [4] Fujiwara, T., Nambarab E., Yamagishib K., Gotoc D. B., Naitoc, S. **Storage Proteins.** American Society of Plant Biologists, 1-12, (2002).
- [5] Ghafoor, A, Ahmad, Z, Qureshi, A.S, Bashir, M. **Genetic relationship in *Vigna mungo* (L.) Hepper and *V. radiata* (L.) R. Wilczek based on morphological traits and SDS-PAGE.** Euphytica, 123:367-378, (2000).
- [6] Ladizinsky G.W., Hymowitz T. **Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies.** Theoretical and Applied Genetics, 54: 680–685, (1979).
- [7] Sözen, Ö. **Artvin ili yerel fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) populasyonlarının toplanması, tanımlanması ve morfolojik varyabilitesinin belirlenmesi.** Yüksek lisans tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, sayfa 1, (2006).
- [8] Liang, X.Q., Luo, M., Holbrook, C.C., Guo, B.Z. **Storage protein profiles in Spanish and runner market type peanuts and potential markers.** BMC Plant Biology, 6:24, (2006).
- [9] Singh S.P., Nodari R., Gepts P. **Genetic diversity in cultivated common bean I. allozymes.** Crop Science, 31:19-23, (1991).
- [10] Yupsanis T.M., Moustakes M., Karakoli S. **Seed protein electrophoresis for varietal identification in rice (*Oryza sativa* L.),** Journal of Agronomy and Crop Science, 168:95–99, (1992).
- [11] Przybylska J., Zimniak-Przybylska Z., Krajewski P. **Diversity of seed albumins in the grass pea (*Lathyrus sativus*): an electrophoretic study,** Genetic Resources and Crop Evolution, 45: 423–431, (1998).
- [12] Ertugrul, K., Arslan, E., Tugay, O. **Characterization of *Consolida* S.F. Gray (Ranunculaceae) taxa in Turkey by seed storage protein electrophoresis.** Turkish Journal of Biochemistry, 35(2):97-102, (2010).

- [13] Tamkoc, A., Arslan, E. **Comparison of Agronomic Characters, Total Seed Storage Proteins and Their Use For Genotypes Discrimination in the Kentucky Bluegrass (*Poa pratensis* L.), Biotechnology and Biotechnological Equipment**, 24(1):1573-1576, (2010).
- [14] Parisi, E., Agulari D., **Methods Differentiating Meats of Different Species of Animals. "Biochemical Identification of Meat Species"** R.L.S. Patterson (Ed). Elsevier Applied Science Publishers Ltd., p. 40-49, England, (1985)
- [15] Saraswati, R., Matoh, T., Phupaibul, P., Lumpkin, T.A., Kobayashi, M. **Identification of Sesbania Species from Electrophoretic Patterns of Seed Protein**, Tropical Agriculture (Trinidad), 70(3): 282-285, (1993).
- [16] Laemmli, U.K., **Cleavage of structural proteins during the Assembly of bacteriophage T4.**, Nature, 227:680-684, (1970).
- [17] Nei, M. **Estimation of average heterozygosities and genetic distances from a small number of individuals.** Genetics 89:583-590, (1978) .
- [18] Sammour, R.H., Radwan, S.A., El-Koly, A. **Genetic diversity in *Phaseolus* spp. as revealed by SDS-PAGE markers.** Plant Genetic Resources Newsletter, 151:69-75, (2007).
- [19] Martins, S.R., Vences, F.J., Saenz de Miera, L.E., Barrosa, M.R., Carnide, V. **RAPD Analysis of genetic diversity among and within Portuguese landraces of common white bean (*Phaseolus vulgaris* L.)**, Scientia Horticulturae, 108:133–142, (2006).
- [20] Svetleva, D., Pereira, G., Carlier, J., Cabrita, L., Leitão, J., Genchev, D. **Molecular characterization of *Phaseolus vulgaris* L. genotypes included in Bulgarian collecti on by ISSR and AFLP™ analyses.** Scientia Horticulturae 109: 198–206, (2006).
- [21] Papa, R., Gepts, P. **Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica.** Theoretical and Applied Genetics, 106:239–250, (2003).
- [22] Lioi, L., Piergiovanni A. R., Pignone, D., Puglisi, S., Santantonio, M., Gabriella S., **Genetic diversity of some surviving on-farm Italian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces.** Plant Breeding. 124(6):576 – 581, (2005).
- [23] Rosales-Serna, R., Hernández-Delgado, S., González-Paz, M., Acosta-Gallegos, J.A., Mayek-Pérez, N. **Genetic Relationships and Diversity Revealed by AFLP Markers in Mexican Common Bean Bred Cultivars**, Crop Science, 45:1951-1957, (2005).
- [24] Sicard, D., Nanni, L., Porfiri, O., Bulfon, D., Papa, R. **Genetic diversity of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* L. landraces in central Italy.** Plant Breeding, 124 :464-472, (2005).