

Domates güvesinin [*Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)] Batı Akdeniz Bölgesi populasyonlarının mitokondrial cytochrome oxidase subunit I (mtCOI)'e göre genetik varyasyonunun incelenmesi

Determination of genetic variation of tomato leafminer [*Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)] populations from west mediterranean region of Turkey based on mitochondrial cytochrome oxidase I (mtCOI)

Utku YÜKSELBABA, Hüseyin GÖÇMEN

Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Antalya

Sorumlu yazar (Corresponding author): U. Yükselbaba, e-posta (e-mail): uyükselbaba@akdeniz.edu.tr

MAKALE BİLGİSİ

Alınış tarihi 15 Haziran 2015
Düzeltilme tarihi 26 Haziran 2015
Kabul tarihi 07 Temmuz 2015

Anahtar Kelimeler:

DNA etiketleme
mtCOI
Tuta absoluta

ÖZ

Bu çalışmada *Tuta absoluta*'nın genetik varyasyonu mtCOI gen bölgesinin dizi analizine göre belirlenmiştir. Bu amaçla zararlının ergin bireyleri Batı Akdeniz bölgesinden Anamur, Gazipaşa, Serik, Antalya-Konyaaltı, Kumluca, Demre, Kınık ve Fethiye populasyonlarından denemelerde kullanılmak üzere 2011 yılında domates bitkisinden toplanmıştır. Tek bir bireyden DNA izolasyonları yapılmış ve her bir populasyondan en az 10 bireyden DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA'lar mtCOI gen bölgesine spesifik "C1-J-2195 Forward ve TL2-N-3014 Reverse" primerleriyle çoğaltılmıştır. Sekans analizi sonunda yaklaşık olarak 747 bazlık sekans dizilimi Mega 4 programı ile dizi doğrulaması yapılarak analiz edilmiştir. Analizler sonucunda populasyonlar arasında ve populasyon içindeki bireyler arasında genetik farklılığın olmadığı belirlenmiştir. Gen bankasından elde edilen verilere göre Türkiye populasyonları ile Güney Amerika ve bazı Avrupa populasyonları arasında yüksek benzerlik olduğu gözlemlenmiştir. Sekans verileri ayrıca gen banka kaydedilmiştir.

ARTICLE INFO

Received 15 June 2015
Received in revised form 26 June 2015
Accepted 07 July 2015

Keywords:

DNA barcoding
mtCOI
Tuta absoluta

ABSTRACT

In this study, the genetic variation of *Tuta absoluta* was studied based on the sequences of mtCOI gene region. For this purpose, the samples of the adult pest were collected from tomato plants grown in Anamur, Gazipaşa, Serik, Antalya-Konyaaltı, Kumluca, Demre, Kınık and Fethiye district of western Mediterranean region in 2011. Minimum ten DNA was extracted individually from each. The mtCOI gene was amplified and sequenced with the primer pair "C1-J-2195 and TL2-N-3014 specific to this region. The sequences were aligned and analyzed by using Mega 4 software program. An approximately 747 base pair of informative sequences were obtained and used in the analyses. The results of the analysis showed that there was no inter and intra-population polymorphism in the sequences of individuals among the populations studied here. A high sequence similarity was found when the sequences of Turkish populations were compared with the Gen bank sequences of the South American and some European populations of the pest. Sequences were deposited in Gene bank.

1. Giriş

Domates güvesi *Tuta absoluta* (Meyrick), domates üretiminde önemli zararlıların başında gelmektedir. Ekonomik olarak önemli ürün kaybına neden olan zararlı aynı zamanda diğer Solanaceae türlerinde de zarar yapabilmektedir. Anavatani Güney Amerika olan domates güvesi, son zamanlarda Avrupa ve Akdeniz ülkelerinde de görülmeye başlamıştır (OEPP/EPPO 2005). Zararlı ilk olarak 2006 yılında İspanya'da görülmüş, daha sonra buradan Avrupa'ya yayılırken ülkemize ise 2009

yılında giriş yapmıştır (Urbaneja ve ark. 2007; Erler ve ark. 2010; Kılıç 2010).

Domates güvesi, domates bitkisinin tüm gelişme dönemlerinde zararlı olabilmektedir. Yumurtadan çıkan larva yaprağın mezofil dokusuna, meyveye ve gövdenin içine girerek beslenir ve beslenme sonucunda galeriler açar (OEPP/EPPO 2005). İnsektisit kullanımı *T. absoluta* ile mücadelede ana kontrol yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak kimyasal

mücadelenin etkinliği zararlının insektisitlere karşı hızlı direnç gelişimiyle sınırlıdır. Ayrıca zararlıya karşı üretilen sentetik eşey feromonları popülasyon düzeyinin belirlenmesinde ve aynı zamanda seralarda erkek bireylerin kitle halinde yakalanmasında kullanılmaktadır. (Salas 2004; Witzgall ve ark. 2010; Proffit ve ark. 2011).

Zararlının tanınmasında esas olarak ergin ve larvadaki morfolojik karakterler kullanılmaktadır. Fakat morfolojik karakterler çoğunlukla popülasyonlar arasındaki genetik farklılıkları ortaya koymada yetersiz kalmaktadır (Yükselbaba ve ark. 2011). Genom tanımlanması ve seçimi 1980'lerin ortasından bu yana PCR teknolojisinin yardımıyla hızlı gelişim göstermiştir. ITS (internal transcribed spacer), mtCOI sekansı, Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD), Basit sekans tekrarları (SSR) ve Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP) böceklerde popülasyon genetiği çalışmalarında geniş kullanım gösteren DNA temelli tekniklerdir (Williams ve ark. 1990; Kimpton ve ark. 1993; Vos ve ark. 1995; Vijayan ve ark. 2006).

Bu çalışmanın esas amacı Batı Akdeniz bölgesindeki *T. absoluta* popülasyonları arasındaki genetik ilişkiyi moleküler genetik metotlardan sitokrom oksidaz altünite I (mtCOI) gen bölgesine göre ortaya koymaktır. Ayrıca popülasyonlardan elde edilen mtCOI gen bölgesi sekanslarının bu bölge ve ülkemiz için referans veri oluşturmasını ve tür teşhisi için DNA etiketlemeyi sağlamaktır.

2. Materyal ve Yöntem

Çalışmada kullanılan örnekler 2011 yılında Çizelge 1'de belirtilen yerlerde kurulan feromon tuzaklar üzerinden toplanmıştır.

Çizelge 1. *Tuta absoluta* örnekleri toplama yerleri ve genbank kayıt numaraları.

Table 1. *Tuta absoluta* sample collection sites and genbank accession numbers.

Örneğin alındığı İlçe/İl	Toplanan (Konukçu) bitki	Genbank kayıt numarası
Anamur / Mersin	<i>Solanum lycopersicum</i> L	KT002414
Demre / Antalya	<i>Solanum lycopersicum</i> L	KT002415
Fethiye / Muğla	<i>Solanum lycopersicum</i> L	KT002416
Gazipaşa / Antalya	<i>Solanum lycopersicum</i> L	KT002417
Antalya Merkez	<i>Solanum lycopersicum</i> L	KT002418
Kınık / Muğla	<i>Solanum lycopersicum</i> L	KT002419
Kumluca / Antalya	<i>Solanum lycopersicum</i> L	KT002420
Serik / Antalya	<i>Solanum lycopersicum</i> L	KT002421

DNA İzolasyonu

Çalışmada DNA izolasyonları tek bir bireyden yapılmış ve her popülasyondan 10 birey alınarak ayrı ayrı DNA izolasyonları yapılmıştır. Domates güvesi DNA izolasyonları EZNA SQ Tissue DNA kit protokolüne göre ergin bireylerden yapılmıştır.

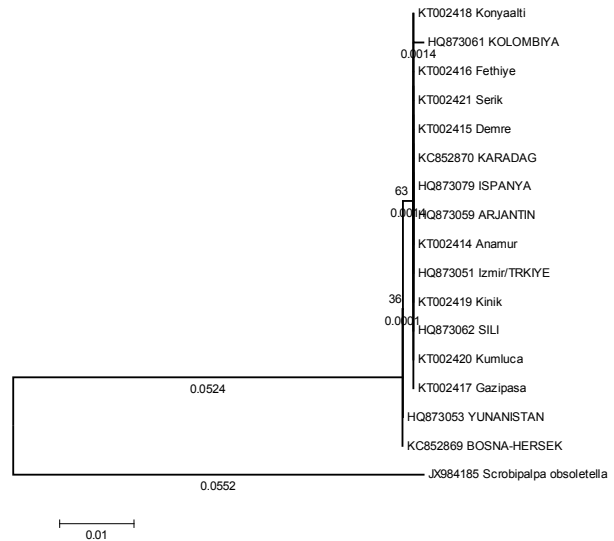
PCR ve Sekans Reaksiyonları

DNA izolasyonunu takiben mtCOI bölgesi "C1-J-2195 ve TL2-N-3014" primerleri (Simon ve ark. 1994) kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır. PCR reaksiyonları 0.5µL kalıp DNA, 0.075µL Taq DNA polymerase (0.4u/ µL), 0.15 µL her bir primerden (0.2 µM), 1µl taq buffer, 1 µl 25mM MgCl₂ toplam 12.5 µL hacimde, 5 dk 94 °C'de, takiben 35 döngü [50 sn 94 °C'de, 50 sn 50 °C'de ve 45 s 72 °C'de] ve son olarak 5 dk 72 °C PCR şartlarında gerçekleştirilmiştir.

Etanol presipitasyonu ile saflaştırılan PCR ürünlerinin sekans dizi analizi BECKMAN CEQ Sequencer cihazında ve Beckman Quickstart kit protokolüne göre, kit karışımından 4 µL kullanılarak yapılmıştır. Dizi analizleri ileri ve geri olmak üzere iki yönlü olarak yapılmıştır. Elde edilen diziler görsel olarak da kontrol edildikten sonra her bir popülasyondan birer örneğin sekans dizilimi genbank veri tabanına (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) kayıt edilmiştir. Her bir popülasyona ait birer referans örnek ve genbank veri tabanından elde edilmiş bazı referans *T.absoluta* dizilimleri Mega 4 programı kullanılarak dizi doğrulama (Aligment) ve filogenetik analize tabi tutulmuştur.

3. Bulgular ve Tartışma

Analizler sonucunda elde edilen nükleotit dizilerinden ortalama 747 bazlık dizilerin yapılan dizi doğrulaması sonucunda popülasyonlar arasında ve popülasyonlar içinde mtCOI bölgesine göre herhangi bir farklılık belirlenmemiştir. Nükleotid kompozisyonu T: % 41.6 C: % 15.0 A: % 29.5 G: % 13.9'dur. Gen bankası sekansları ile yapılan analiz sonucunda 744 sabit, 2 değişken ve 1 filogenetik bilgi verici nükleotit bölgesi mevcuttur. Çalışmadaki sekans dizilimleri İspanya, Şili, Arjantin, Karadağ ve İzmir genbank referans dizilerle aynı iken Bosna-Hersek, Yunanistan referans dizilimleri ile 1 nükleotit farklılık ve yine Kolombiya referans dizilimi ile 1 nükleotit farklılık göstermiştir (Şekil 1).



Şekil 1. *Tuta absoluta* popülasyonlarının neighbour joining filogenetik ağacı. Neighbour joining filogenetik ağacı Kimura two-parameter model ve 500 bootstrap tekrarı ile oluşturulmuştur.

Figure 1. Phylogenetic tree of *Tuta absoluta* populations based on neighbour joining. Neighbour joining phylogenetic tree was inferred using Kimura two-parameter model and 500 bootstrap replicates.

Cifuentes ve ark. (2011) *T. absoluta* Akdeniz ve Güney Amerika popülasyonlarının mtCOI ve ITS rDNA bölgelerinin sekansına göre zararlıda tek tip genetik özellik olduğunu belirtmişlerdir. Duric ve ark. (2014) Bosna-Hersek ve Karadağ popülasyonlarının mtCOI bölgelerinin %100 benzer olduğunu ve bunların Sırbistan, Tunus, İspanya, Şili, İtalya, Arjantin ve Türkiye Gen bankası sekans dizilimleri ile aynı olduğunu belirtmişlerdir.

Flores ve ark. (2003) dört Arjantin popülasyonunun allozim polimorfizmlerini çalışmışlar ve *T. absoluta* popülasyonlarının yüksek genetik benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir. Suinaga ve ark. (2004) AFLP tekniğini kullanarak Brezilya popülasyonları arasındaki genetik farklılığı çalışmışlardır ve popülasyonların insektisit direncinden kaynaklandığını belirttikleri iki farklı genetik gruba ayrıldığını belirtmişlerdir. Bettaibi ve ark. (2012) yedi Tunus popülasyonunun genetik farklılığını RAPD-PCR tekniğini kullanarak belirlemeye çalışmışlar ve popülasyonlar içinde ve popülasyonlar arasında yüksek genetik çeşitlilik belirlemişlerdir. Yüksek genetik farklılığın *T. absoluta*'nın farklı genotiplerin Tunus'a girmesinden kaynaklandığını belirtmektedirler. Guillemaud ve ark. (2015) mikrosatellit marker kullanarak Güney Amerika, Avrupa, Afrika ve Ortadoğu popülasyonlarının genetik farklılıklarını çalışmışlar ve Akdeniz çevresindeki istilacı popülasyonların orijininin aynı olduğunu, Şili veya Şili'ye yakın ve muhtemelen Maule bölgesi olduğunu ve Akdeniz bölgesi popülasyonlarının zayıf bir genetik yapı gösterdiğini, bu sebepten istilacı popülasyonların orijinlerinin tam olarak belirlenmesinin mümkün olmadığını belirtmişlerdir. Çalışmalarında Güney Amerika popülasyonlarının genetik olarak homojenlikten uzak olduğunu belirtmişlerdir.

4. Sonuç

Çalışmada kullanılan popülasyonlar arasında ve popülasyonlar içinde mtCOI bölgesine göre genetik farklılık belirlenememiş ve popülasyonlar tek tip genetik özellik göstermiştir. Gen bankasından elde edilen sekans dizilimleri ile belirlenen yüksek genetik benzerlik Türkiye popülasyonlarının Güney Amerika orijinli olduğunu güçlendirmektedir. Elde edilen sekans dizilimleri ülkemiz için referans veri oluşturarak ilerde mtCOI bölgesine göre herhangi bir biyotip/ırk değişiminin veya farklılığının belirlenmesinde referans veri oluşturacaktır. Aynı zamanda Batı Akdeniz Bölgesi *T. absoluta* popülasyonların DNA etiketlemesi yapılmış ve Gen bankasına kayıt edilmiştir (Çizelge 1). Elde edilen verilere, Cifuentes ve ark. 2011 ile Duric ve ark. 2014'e göre mtCOI bölgesi *T. absoluta*'nın tür teşhisinde güvenilir iken popülasyonlar arasında ve popülasyon içindeki genetik farklılıkları belirlemede yetersiz kalmaktadır. Diğer moleküler teknikler *T. absoluta* popülasyonlarının genetik özelliklerini belirleme potansiyeline sahip olabilmektedir (Suinaga ve ark. 2004; Bettaibi ve ark. 2012; Guillemaud ve ark. 2015). Ülkemiz popülasyonlarının mtCOI bölgesinin sekansından farklı olarak diğer moleküler teknikler kullanılarak genetik özelliklerinin belirlenmesi ile ülkemizde *T. absoluta*'nın genetik varyasyonu konusundaki eksikliği giderilmiş olacaktır.

Kaynaklar

Bettaibi A, Mezghani-Khemakhem M, Bouktila D, Makni H, Makni M, (2012) Genetic Variability of the tomato leaf miner (*Tuta absoluta* Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae), in Tunisia, inferred from RAPD-PCR. *Chilean Journal of Agricultural Research* 72(2) 212-216

Cifuentes D, Chynoweth R, Bielza P (2011) Genetic study of Mediterranean and South American populations of tomato leafminer *Tuta absoluta* (Povolny, 1994) (Lepidoptera: Gelechiidae) using ribosomal and mitochondrial markers. *Pest Management Science* 67(9): 1155-1162

Duric Z, Delic D, Hrcic S, Radonjic S, (2014) Distribution and molecular identification of *Tuta absoluta* (MEYRICK, 1917) (Lepidoptera, Gelechiidae) populations in Bosnia and Herzegovina and Montenegro. *Polish journal of Entomology* 83: 121-129

Erler F, Can M., Erdogan M, Ateş AO, Pradier T (2010) New Record of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) on Greenhouse-Grown Tomato in Southwestern Turkey (Antalya). *Journal of Entomological Science* 45(4): 392-393

Flores LV, Gilardon E, Gardenal CN (2003) Genetic Structure of populations of *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Basic & Applied Genetics* 15(1): 29-32

Guillemaud T, Blin A, Le Goff I, Desneux N, Reyes M, Tabone E, Tsagkarakou A, Nino L, Lambert E (2015) The tomato borer, *Tuta absoluta* invading the Mediterranean Basin, originates from a single introduction from Central Chile. *Scientific reports*. doi: 10.1038/srep08371

Kılıç T (2010) First record of *Tuta absoluta* in Turkey. *Phytoparasitica* 38: 243-244

Kimpton CP, Gill P, Walton A, Urquhart A, Millican ES, Adams M (1993) Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR methods and applications* 3: 13-22.

OEPP/EPO (2005) Data sheets on quarantine pests: *Tuta absoluta*. EPO Bulletin 35: 434-435.

Proffitt M, Birgersson G, Bengtsson M, Reis Jr. R, Witzgall P, Lima E (2011) Attraction and Oviposition of *Tuta absoluta* Females in Response to Tomato Leaf Volatiles. *Journal of Chemical Ecology* 37:565-574

Salas J. (2004) Capture of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in traps baited with its sex pheromone. *The Revista Colombiana de Entomología* 30: 75-78.

Simon C, Frati F, Bechenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequence and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87: 651-701.

Suinaga FA, Casali VWD, Picanço M, Foster J (2004) Genetic divergence among tomato leafminer populations based on AFLP analysis. *Pesq. Agropec. Bras.* 39(7) 645-651

Urbaneja A, Vercher R, Navarro V, Garcı'a Mari' F, Porcuna JL (2007) La polilla del tomate, *Tuta absoluta*. *Phytoma Espana* 194: 16-23

Vijayan K, Anuradha HJ, Nair CV, Pradeep AR, Awasthi AK, Saratchandra B, Rahman SAS, Singh KC, Chakraborti R, Urs SR (2006) Genetic diversity and differentiation among populations of the Indian eri silkworm, *Samia cynthia ricini*, revealed by ISSR markers. *Journal of Insect Science* 6: 1-11

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijers M, Van De Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.

Yükselbaba U, Göçmen H, İkten C (2011) *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)'nın mitokondrial cytochrome oxidase subunit I (mtCOI) gen bölgesinin belirlenmesi. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi 28-30 Haziran 2011, sf. 251, Kahramanmaraş.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18, 6531-6535.

Witzgall P, Kirsch P, Cork A (2010) Sex pheromones and their impact on pest management. *Journal of Chemical Ecology* 36(1): 80-100