

## **Zucchini yellow mosaic virüsüne tolerant yazlık kabak (*Cucurbita pepo*) hatlarında genetik farklılığın SRAP markır sistemleriyle belirlenmesi\***

**Çetin NACAR<sup>1</sup>, Veysel ARAS<sup>1</sup>, Sevinç TEKİN<sup>1</sup>, Hakan FİDAN<sup>2</sup>, Mustafa ÜNLÜ<sup>1</sup>, Nebahat SARI<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü 33740 Erdemli-MERSİN

<sup>2</sup>Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakùltesi, Bitki Koruma Bölümü, ANTALYA

<sup>3</sup>Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakùltesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, ADANA

\*:Bu proje, ZYMV(Zucchini Yellow Mosaic Virus)'ye Tolerant Kabak Hatlarının Hibrit Performanslarının Belirlenmesi (Proje No: TAGEM/BBAD/16/A09/P04/04) projesi kapsamında TAGEM tarafından desteklenmiştir.

Alınış tarihi: 14 Ekim 2016, Kabul tarihi: 28 Kasım 2016

Sorumlu yazar: Çetin NACAR, e-posta: cetinnacar@yahoo.com

### **Öz**

Gen havuzunda bulunan yazlık kabak genotiplerinin moleküler karakterizasyonu ve bunlar arasındaki akrabalık derecelerinin tespit edilmesi ıslah programları açısından önemlidir. Bu çalışmanın amacı F1 hibrit kabak ıslah programlarında kullanılmak üzere Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü (ABKAE) gen havuzunda bulunan Zucchini Yellow Mosaic Virüsü (ZYMV)'ne tolerant hatların moleküler olarak uzaklık derecelerinin ortaya çıkarılmasıdır. Çalışmada ZYMV'ye tolerant 38 hatta 11 SRAP markır çifti ile moleküler karakterizasyon yapılmıştır. Benzerlik İndeksinden yararlanılarak UPGMA metodu ile kümeleme (Cluster) analizleri yapılmış ve dendrogram elde edilmiştir. Dendrogram incelendiğinde hatların birbirinden ayrıldığı, hatlar arasında çeşitliliğin olduğu görülmüştür. 38 adet hattın genetik benzerlik düzeyi 0.63 ile 0.95 arasında değişmiştir. 0.74 benzerlik düzeyinde 5 ana grup tespit edilmiştir. Oluşan 5 ana farklı heterotik grubu temsilen seçilen hatlar ileride ZYMV'ye tolerant yazlık kabak ıslahında kullanılabilir.

**Anahtar kelimeler:** Yazlık kabak, ZYMV, moleküler karakterizasyon, SRAP

**Determination of genetic diversity by SRAP marker systems in tolerant to zucchini yellow mosaic virus in squash (*Cucurbita pepo*)**

### **Abstract**

Detection of the molecular characterization and genetic neighborhood between squash genotypes in the gene pool is important for breeding programs. The aim of this study is to uncover the molecular degree of the lines that is tolerant to ZYMV (Zucchini Yellow Mosaic Virus), however this lines will be used in F1 hybride squash breeding program in Alata Horticultural Research Institute (ABKAEM). We used 11 SRAP marker to screen 38 ZYMV tolerant lines for molecular characterization. The UPGMA method is used to make cluster analyses by utilising smilarity index and a dendogram is created. According to dendrogram we saw that the lines are separating in each other and there is a significant diversity among lines. Genetic similarity degree of the 38 line is changing between 0.63 to 0.95. We determined 5 main groups at 0.74 similarity degree. This study may precipiate to squash breeding program for the next studies with this characterized lines choosen among this 5 main heterotic groups.

**Key words:** Squash, ZYMV, molecular characterization, SRAP

### **Giriş**

Dünya kabak üretimi yaklaşık 25.2 milyon tondur. Ülkemiz yaklaşık 394 bin ton ile dünya üretiminde on ikinci sırada yer almaktadır (FAO, 2014). Türkiye yazlık kabak üretimi bölgelere göre ya açıkta, ya da örtüaltında yapılmaktadır. Örtüaltı yetiştiriciliği genelde Akdeniz bölgesinde gerçekleştirilmektedir (TÜİK, 2015).

Yazlık kabak yetiştiriciliğindeki en büyük sorun Zucchini Yellow Mosaic Virusü (ZYMV) olarak karşımıza çıkmakta ve ekonomik olarak önemli zararlar oluşturmaktadır. İlk kez İtalya'da rapor edilen ZYMV'nin dünyanın birçok ülkesinde (Avustralya, Fransa, Mısır, Almanya, İsrail, Japonya, Ürdün, İspanya, Fas ve Türkiye) yaygın olduğu ve zarar verdiği bildirilmektedir (Purcifull,1984). Türkiye'de değişik bölgelerde yapılan çalışmalarda kabakgil üretiminin yapıldığı yerlerde ZYMV'nin yoğun olarak bulunduğu ve ciddi zarar oluşturduğu tespit edilmiştir (Özalp, 1964; Yılmaz ve Davis, 1985; Ertunç, 1992; Vargün ve Ertunç, 1994; Sarı ve ark., 1996; Uçar ve Ertunç, 1998). Yetiştiricilikte bu virüse dayanıklı/tolerant olan çeşitler tercih edilmektedir. Hibrit yazlık kabak çeşitleri geliştirilirken de ZYMV'ye dayanıklı/tolerant olması en önemli kriter olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak ülkemizde ZYMV'ye dayanıklı/tolerant çeşitlerin geliştirilmesi konusunda çok az çalışma bulunmaktadır. Nacar ve ark. (2012a), 2008-2010 yılları arasında Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü (ABKAEM)'de yaptıkları çalışmada; üretimi yaygın olarak yapılan ZYMV'ye toleran Otto F1 hibrit çeşidi donör bitki olarak kullanılmış, Alata 6 ve Alata 50 adlı iki saf genotipe ZYMV'ye toleranlığı aktarmaya çalışmıştır. Dört defa geriye melezleme yapılmış, her geriye melezlemede mekanik inokulasyon yöntemi gerçekleştirilmiş ve iki genotipte ZYMV'ye toleranlık elde edilmiştir.

Nacar ve ark. (2011), ABKAEM gen havuzunda bulunan 96 kabak hattını SRAP moleküler markırları ile karakterize etmişlerdir. Bu çalışma 96 adet yazlık kabak hattı ile yürütülmüş ve 8 adet SRAP markırı kullanılmıştır. Toplam 34 bandın elde edildiği çalışmada bantların 13 adedi polimorfik bulunmuştur. Genetik benzerliğinin 0.84-0.99 arasında olduğu kaydedilmiştir. Bu çalışma sonucunda, ıslah programları açısından ABKAİ genetik koleksiyonlarında bulunan kabak hatları arasında kayda değer varyasyon bulunduğu tespit edilmiştir. Nacar ve ark. (2012b), yazlık kabak ıslah programlarında kullanılmak üzere ABKAEM gen havuzunda bulunan yazlık kabak hatların SRAP moleküler markırları ile karakterize etmişlerdir. PCR çalışmalarında bir ileri ve bir geri primer çifti birlikte kullanıldığından öncelikle toplam 208 adet primer kombinasyonu test edilmiştir. 23 SRAP primer kombinasyonu kullanılarak toplam 166 bant elde

edilmiştir. SRAP analizlerinde benzerlik düzeylerinin 0.60 ile 0.99 arasında dağıldığı ve 0.74 benzerlik düzeyinde 7 ana grup tespit edildiği bildirilmiştir.

Bu çalışmadaki amacımız Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü gen havuzunda bulunan ve farklı projeler ile geliştirilen ZYMV'ye dayanıklı/tolerant 38 hattın, SRAP markırları ile moleküler karakterizasyonunu yaparak uzaklık derecelerinin ortaya çıkarılması ve bu sonuçların ıslah çalışmalarında kullanılmasıdır.

### Materyal ve Yöntem

Bu çalışma ile daha önceki yıllarda ABKAEM gen havuzunda bulunan ZYMV'ye tolerant 38 adet yazlık kabak hattı kullanılmıştır.

Araştırmada ZYMV'ye tolerant hatların moleküler karakterizasyon çalışmaları ve ıslah çalışmalarında kullanılmak üzere heterotik grupların oluşturulması yapılmıştır.

### DNA İzolasyon Çalışmaları, Elektroforez ve Jel Görüntüleme Çalışmaları

DNA ekstraksiyonu için her bir genotipe ait bitkilerden yaklaşık 20 g genç yaprak toplanmıştır. Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Biyoteknoloji Laboratuvarına getirilen yaprakların mekanik parçalanması 'Roller Press' (Dayton Electric Co. Illinois, USA) aleti ile gerçekleştirilmiştir. DNA ekstraksiyonu Doyle ve Doyle (1990) yönteminden modifiye edilmiş CTAB protokolüne göre yapılmıştır. DNA ekstraksiyonunun akabinde SRAP primerleri kullanılarak PCR işlemi yapılmış, elde edilen PCR ürünleri jel elektroforezi (%2'lik) ile görüntülenmiştir. Jel görüntülerinde bantların skorlamaları var (1) ve yok (0) şeklinde değerlendirilmiş ve primer kombinasyonları için toplam bant sayısı (TBS), polimorfik bant sayısı (PBS) ve polimorfizm oranları (%) belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan SRAP primerlerinin polimorfizm oranları aşağıdaki formülasyonla belirlenmiştir:

Polimorfizm Oranı (%)= (Polimorfik Bant Sayısı/Toplam Bant Sayısı) x 100

### İstatiksel değerlendirme

Moleküler karakterizasyon sonucu elde edilen gözlemler rakamsal veriler halinde Microsoft Excel programına girilmiş ve bu kategorik değişkenlerde Temel Koordinat Analizleri (PCoA) için NTSYS-PC paket programı kullanılmıştır.

Öncelikle Jaccard (1908) yöntemi kullanılarak benzerlik matrisi oluşturularak UPGMA metodu ile kümeleme (Cluster) analizleri yapılmış ve dendrogramlar elde edilmiştir. Dendrogramların benzerlik matrisini ne ölçüde temsil ettiği Mantel Matris Uyum Testi (Mantel's matrix correspondence test) ile belirlenmiştir (Mantel, 1967). Bu test sonucunda kofenetik korelasyon katsayısı (cophenetic correlation coefficient), 'r', değeri elde edilmiştir.

### Moleküler karakterizasyon ve heterotik grup oluşturma çalışmaları

Moleküler karakterizasyon çalışmalarında SRAP tekniği kullanılmıştır. Moleküler karakterizasyon çalışmaları ABKAE Biyoteknoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Araştırmada genotiplerin akrabalık derecelerinin belirlenmesi amacıyla, genetik markırlardan faydalanılmış ve bu amaçla SRAP analizleri yapılmıştır. Bu amaçla daha önceki çalışmalar sonucunda görülen (Nacar ve ark., 2012b) en iyi 11 adet SRAP primer çifti (Çizelge 1) kullanılmıştır.

Çizelge 1. Primer test çalışmalarında iyi sonuç veren ve tüm örneklerin çalışıldığı primer kombinasyonları

Sıra no	SRAP primer kombinasyonları	Sıra no	SRAP primer kombinasyonları
1	ME2-EM3	7	ME4-EM2
2	ME3-EM6	8	ME7-EM4
3	ME4-EM4	9	ME4-EM14
4	ME2-EM4	10	ME5-EM2
5	ME4-EM13	11	ME2-EM14
6	ME2-EM6		

### Bulgular

Çalışmada kullanılan 11 SRAP primer çift değerlendirildiğinde; toplam 37 adet bant elde edilmiş (ortalama 3.36) ve bunların 36 adedi polimorfik bulunmuştur (ortalama 3.27). Primer çiftlerinin bant uzunluk aralıkları 340 ile 950 bp arasında değişiklik göstermiştir. En fazla bant sayısı 6 bant ile ME3-EM6 primer çiftinde görülmüştür. En

az bant sayısı 2 bant ile ME4-EM4, ME4-EM13 ve ME7-EM4 primer çiftlerinde görülmüştür. En fazla polimorfik bant sayısı 6 bant ile ME3-EM6 primer çiftinde görülmüştür. En az polimorfik bant sayısı ME4-EM4, ME4-EM13 ve ME7-EM4 primer çiftlerinde görülmüştür. Tüm primer çiftlerinin ortalama polimorfizm oranı % 98.18 olmuştur (Çizelge 2).

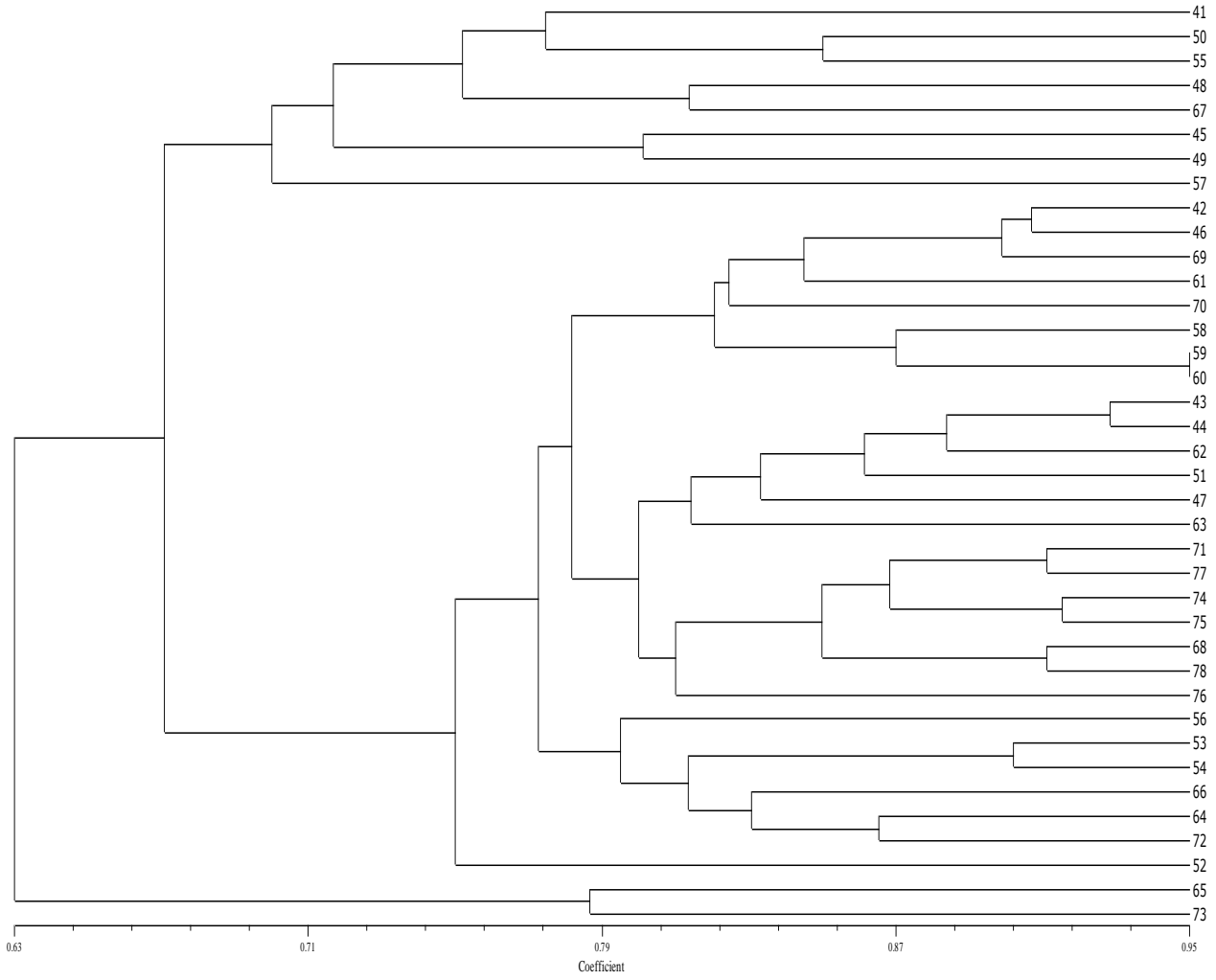
Çizelge 2. Çalışmada kullanılan yazlık kabak genotiplerine ait, her primer çifti için, bant uzunluk aralıkları (bp), toplam bant sayısı, polimorfik bant sayısı ile polimorfizm oranları

Primer Çifti	<sup>1</sup> TBS	<sup>2</sup> PBS	<sup>3</sup> PO (%)	<sup>4</sup> BUA (bp)(min-max)
ME2-EM3	5	4	80	540-940
ME3-EM6	6	6	100	340-820
ME4-EM4	2	2	100	900-930
ME2-EM4	3	3	100	620-850
ME4-EM13	2	2	100	980-910
ME2-EM6	3	3	100	510-910
ME4-EM2	3	3	100	830-950
ME7-EM4	2	2	100	810-930
ME4-EM14	4	4	100	550-890
ME5-EM2	4	4	100	590-880
ME2-EM14	3	3	100	610-910
Toplam	37	36		
Ortalama	3.36	3.27	98.18	

<sup>1</sup>TBS: Toplam Bant Sayısı, <sup>2</sup>PBS: Polimorfik Bant Sayısı, <sup>3</sup>PO: Polimorfizm Oranı ve <sup>4</sup>BUA: Bant Uzunluk Oranları

Çalışmada ZYMV'ye tolerant 38 hatta SRAP markırları ile moleküler karakterizasyon yapılmış ve bu veriler Numerical Taksonomi Multivaryasyon Analiz yöntemiyle NTSYS-PC Versiyon 2.1 bilgisayar

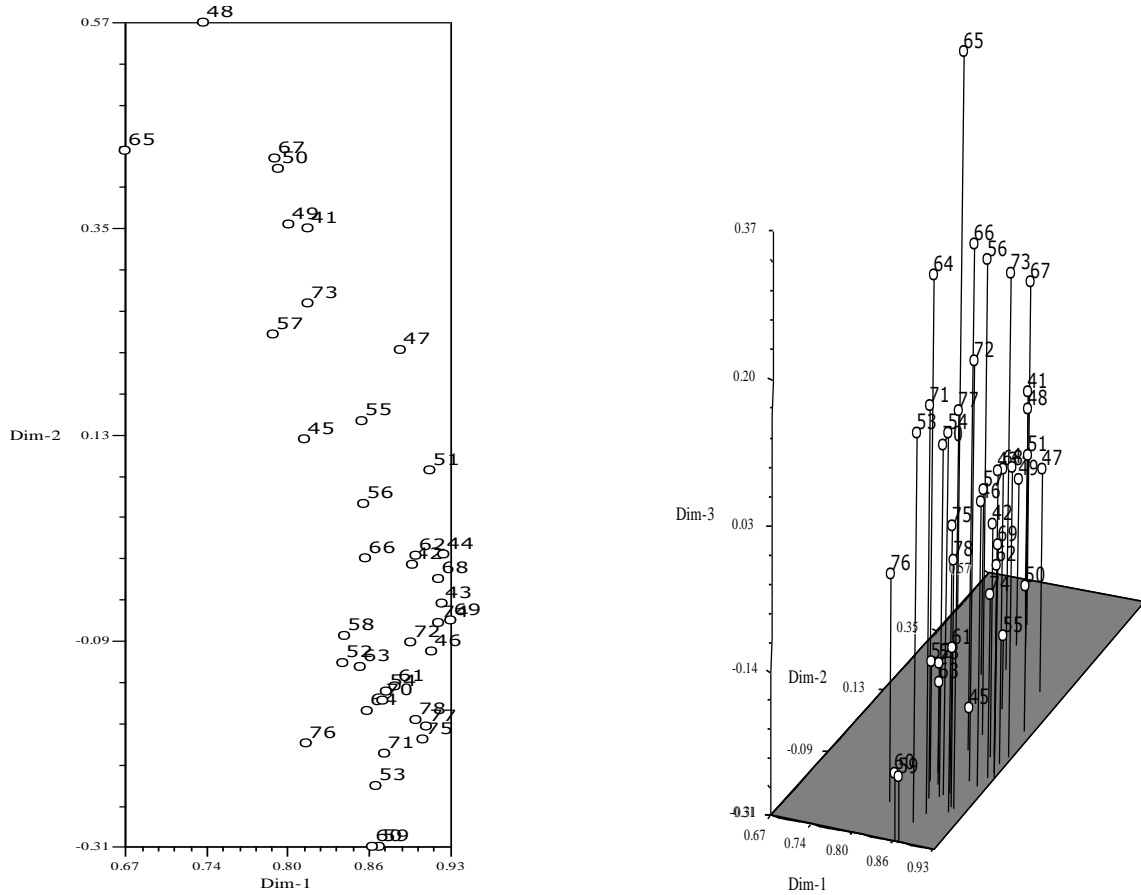
paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. Benzerlik indeksinden yararlanılarak UPGMA metodu ile kümeleme (Cluster) analizleri yapılmış ve dendrogram elde edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. ZYMV'ye tolerat yazlık kabak hatlarının arasındaki benzerlik korelasyon matrisi kullanılarak ve UPGMA metoduna göre oluşturulmuş dendrogram.

ZYMV'ye tolerat 38 hattın moleküler karakterizasyon bulguları, genotipler arasında çeşitlilikler olduğunu göstermiştir. Dendrogram incelendiğinde hatların birbirinden ayrıldığı ve önemli çeşitlilikler gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca yazlık kabak hatlarının temel bileşenler analizi (PCA) ile elde edilen üç boyutlu düzlem grafiği ve iki boyutlu düzlem grafiğinde de çeşitlilik açıkça görülmektedir (Şekil 2). Hatların genetik benzerlik

düzeyi 0.63 ile 0.95 arasında değişmiştir. Mantel testi sonucunda R değeri 0.73687 çıkmıştır. 0.74 benzerlik düzeyinde 5 ana grup tespit edilmiştir. Grup 1'de 5 hat (41, 50, 55, 48, 67) bulunurken, Grup 2'de 2 hat (45, 49), Grup 3'de 1 hat (57), Grup 4'de 28 hat (42, 46, 69, 61, 70, 58, 59, 60, 43, 44, 62, 51, 47, 63, 71, 77, 74, 75, 68, 78, 76, 56, 53, 54, 66, 64, 72, 52), Grup 5'de 2 hat (65, 73) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 2. ZYMV'ye tolerant yazlık kabak hatlarının temel bileşenler analizi (PCA) ile elde edilen iki boyutlu düzlem ve üç boyutlu düzlem grafiği.

### Tartışma ve Sonuç

Sonuç olarak, bu çalışmada ABKAE gen havuzunda bulunan ZYMV'ye tolerant 38 yazlık kabak hattının SRAP moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. 0.74 benzerlik düzeyinde oluşan 5 ana farklı heterotik grup içerisinde bu grupları temsilen seçilen hatlar ileride ZYMV'ye tolerant yazlık kabak ıslahında kullanılmak üzere seçilmiştir. Daha önce yapılan birçok çalışma da çalışmamızı desteklemektedir (Ferriol ve ark., 2004). SRAP analizleri sonucunda 11 primer kombinasyonu 148 bant oluşturmuş ve bunlardan 98 adedi (% 62) polimorfik olarak tespit edilmiştir. İnan (2008), farklı kabakgil türlerinin (*C. pepo*, *C. moschata* ve *C. maxima*) moleküler karakterizasyonu için 24 genotip kullanmıştır. Moleküler çalışmalarda sekiz SRAP (ME1, ME2, ME6, ME8, EM1, EM2, EM3 ve EM6) primer kombinasyonu kullanılarak toplam 71 bant elde edilmiş ve bunların da hepsi polimorfik bulunmuştur. Nacar ve ark. (2011), ABKAİM gen havuzunda bulunan 96 kabak hattını SRAP moleküler markırları ile karakterize

etmişlerdir. Yazlık kabak hatları(96 adet) ile yürütülen bu çalışmada 8 adet SRAP (ME4, ME5, ME6, ME7, ME8, EM1, EM2 VE EM3) markırı kullanılmıştır. Toplam 34 bandın elde edildiği çalışmada bandların 13 adedi polimorfik bulunmuştur. 96 adet yazlık kabak hattının genetik benzerliği 0.84-0.99 arasında bulunmuştur. ABKAİM genetik koleksiyonlarında bulunan kabak hatları arasında kayda değer varyasyon bulunduğu tespit edilmiştir. Yine Nacar ve ark. (2012b), ABKAİM gen havuzunda bulunan 59 kabak hattını SRAP moleküler markırları ile karakterize etmişlerdir. Moleküler karakterizasyon çalışmalarında 23 adet SRAP primeri çifti kullanılmış, toplam 166 adet bant elde edilmiş, bunların 155 adedi polimorfik bulunmuştur. Tüm primer çiftlerinin ortalama polimorfizm oranı % 92.04 olmuştur. Dendrogram incelendiğinde genotiplerin birbirinden ayrıldığı görülmüştür. 0.74 benzerlik düzeyinde 7 ana grup tespit edilmiştir. Genotipler arasında önemli çeşitlilikler olduğu tespit edilmiş ve bu da çalışmamızı desteklemiştir.

**Kaynaklar**

- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1990. A Rapid Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
- Ertunç, F., 1992. Ankara İlinde Kabaklarda Enfeksiyon Oluşturan Viral Etmenlerin Teşhisi Üzerine Araştırmalar. A. Ü. Ziraat Fak.Yay., No: 1252.
- FAO, 2014. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Erişim Tarihi: 19.12.2016.
- Ferriol, M., Pico, B., Nuez, F., 2004. Morphological and Molecular Characterization of *Cucurbita maxima* Landraces. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 129 (1): 60-69.
- İnan, N., 2008. Çekirdek Kabaklarında Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyon. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Adana, 60 s.
- Jaccard, P., 1908. Nouvelles Recherches sur la Distribution Florale, *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.*, 44: 223-270.
- Mantel, N., 1967. The Detection of Disease Clustering and Generalized Regression Approach. *Cancer Res.*, 27: 209-220.
- Nacar, Ç., Pınar, H., Ünlü, M., Aras, V., Denli, N., Keleş, D., 2011. Bazı Yazlık Kabak (*Cucurbita pepo*) Hatlarında Genetik Farklılığın SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism) Marker Sistemleriyle Belirlenmesi. 6. Bahçe Bitkileri Kongresi, 1: 383-387.
- Nacar, C., Fidan, H., Ekbiç, E., Aras, V., Denli, N., Keleş, D., 2012. Development of Suitable Sources of Resistance to ZYMV in *Cucurbita pepo*. Proceedings of the Xth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae, 633-638.
- Nacar, Ç., Sarı, N., Mutlu, N., 2012. Determination of Heterotic Groups in Summer Squash (*Cucurbita pepo* L.) Using Morphological and Molecular Methods. Proceeding of the Xth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae, 723-732.
- Özalp, M. O., 1964. İzmir İli Civarında Görülen Önemli Sebze Virüsleri Üzerinde İncelemeler. *Bitki Koruma Bülteni*, 4 (1): 18-25.
- Purcifull, D. E., Aldrez, W. C., Simone, G. W., Hiebbert, E., Christie, S. R., 1984. Serological Relationships and Partial Characterization of Zucchini Yellow Mosaic Virus Isolated from Squash in Florida. *Plant Diseases*, 68: 230-233.
- Sarı, N., Abak, K., Yılmaz, M.A., Harbelioğlu, A., 1996. Effects of Cross Protection by ZYMV-WK and Agryl on occurrence of ZYMV, Fruit Yield and Quality. 1st Egyptian Hungarian Horticultural Conference, II: 106-111.
- TÜİK, 2015. Bitkisel Üretim İstatistikleri. <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (07.10.2016)
- Uçar, F., Ertunç, F., 1998. Antalya İli Kabak Seralarında Görülen Zucchini Sarı Mozayik Virüsünün Enfeksiyon Kaynaklarının Belirlenmesi Üzerine Araştırmalar. Türkiye VII. Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, 228-233.
- Vargün, Z., Ertunç, F., 1994. Research on Interaction of Cucumber Mosaic and Zucchini Yellow Mosaic Virus on Squash. 9<sup>th</sup> Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, 387-391.
- Yılmaz, M.A., Davis, R.F., 1985. Identification of Viruses Infecting Vegetable Crops Along the Mediterranean Sea Coast in Turkey. *J. Turkish Phytopathology*, 14.