

Çerezlik Kabak (*Cucurbita pepo* L.) Hatlarının SSR (Simple Sequence Repeat) Markörleri ile Karakterizasyonu*

Necibe KAYAK*¹, Önder TÜRKMEN¹, Ali Tefvik UNCU², Yeşim DAL¹

1: Selçuk University Faculty of Agriculture Department of Horticulture

2: Necmettin Erbakan University Faculty of Science Department of Molecular Biology and genetics

Özet: Bu çalışma, S4 kademesindeki 83 adet çerezlik kabak (*Cucurbita pepo* L.) genotipinde SSR markörleri ile genetik çeşitlilik analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında ifadelene genomik lokuslardan geliştirilmiş olan 31 adet EST-SSR markörü kullanılmış olup toplamda 107 tanesi (% 87.70) polimorfik olan toplam 122 adet bant elde edilmiştir. SSR alelleri var/yok (1/0) şeklinde skorlanmış olup veri dosyası DARwin programında genetik çeşitlilik analizlerine tabi tutulmuş, çerezlik kabak genotipleri arasındaki moleküler genetik ilişkileri gösteren neighbor joining (NJ) dendrogramı çizilmiştir. Dendrogram çerezlik kabak genotiplerinin üç grupta toplandığını göstermektedir. Çalışma kapsamında kullanılan markörlerin en yüksek PIC değeri 0.42 olarak bulunmuştur. Uzaklık matrisi ve NJ dendrogramı arasındaki korelasyon, Mantel testi sonucu ile ortaya konmuştur ($r = 0.99$). Moleküler genetik verilere dayanarak çalışılan koleksiyonda hesaplanan genetik ilişkiler moleküler ıslah programlarında önemli fayda sağlayacaktır.

Anahtar sözcükler: Çerezlik Kabak, Moleküler Karakterizasyon, SSR markörleri.

Characterization of Edible Seed Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) Lines by SSR (Simple Sequence Repeat) Markers

Abstract: The present work involves the molecular characterization of a collection of 83 well-established edible seed pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) lines in the prospective S4 stage. Molecular genetic diversity among the pumpkin genotypes was determined by SSR markers. 31 EST-SSR markers yielded a total of 122 amplified DNA fragments. Out of the 122 SSR alleles, 107 (87.70%) were polymorphic and were used to measure the degree of genetic diversity among pumpkin accessions. The DARwin software was used to generate a Dice coefficient dissimilarity matrix which was then used to construct an unweighted neighbor joining dendrogram of the accessions. Neighbor joining dendrogram demonstrated that the germplasm collection was clustered into three main groups. The highest PIC value calculated for the marker set was 0.42. According to the Mantel test results, correlation of the dissimilarity matrix and the dendrogram was 0.99, indicating a very strong degree of correlation. Genetic relationships within the population inferred based on molecular genetic data will provide valuable information to breeders for future breeding programs.

Keywords: Edible seed pumpkin, molecular characterization, SSR Markers.

GİRİŞ

Kabakgiller (*Cucurbitaceae*); *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata* ve *Cucurbita pepo* gibi türleri bünyesinde barındıran Dünya'da ve Türkiye'de ekonomik değeri yüksek olan bitki türlerini içerir. *Cucurbita pepo* L., *Cucurbitaceae* familyası içinde ekonomik değeri ve genetik çeşitliliği yüksek olan önemli bir türdür (Robinson ve ark., 1976). Ülkemizde çerezlik tüketim amaçlı yetiştirilmekte olan çekirdek kabakları, çoğunlukla *Cucurbita pepo* L.

türü içerisinde bulunmaktadır (Seymen ve ark., 2012; Türkmen ve ark., 2015; Yavuz ve ark., 2015a; Yavuz ve ark., 2015b).

Dünya'da 2.004.058,00 ha alanda 25.196.723,00 ton kabak üretilmektedir. Türkiye de 22.300,00 ha alanda 393.530,00 ton kabak üretilmektedir. Türkiye çerezlik kabak üretimi 552.648 dekar alanda 36.331 tondur (TUİK, 2014).

Türkiye'nin iç bölgelerinde kabak yetiştiriciliğinde daha çok yemeklik ya da bal kabağı yerine çerezlik kabak tercih edilmektedir. Bunun sebepleri arasında; yemeklik kabak yetiştiriciliğinde yüksek verim için sulamanın zorunlu olması, hasadın sık yapılması, hasat edilen meyvelerin muhafaza sürelerinin kısa olması gibi nedenler yer almaktadır. Ayrıca çekirdek kabak yetiştiriciliği kıraç koşullarda dahi yapılabilmektedir. Bu noktada çerezlik kabak yetiştiriciliğinin en önemli eksikliklerinden birisi ortaya çıkmaktadır. Ülkemizde tescilli yapılmış çerezlik kabak çeşitlerinin yetersizliği üreticileri zor duruma sokmaktadır. Piyasada tescilli çeşitlerin bulunmaması üreticilerin tohum temininde sıkıntı yaşamasına ya da tohumluk olarak sadece bir lokasyonda kullanılan tohumun başka bir bölgede yeter verim düzeyine ulaşmaması gibi sorunlar ortaya çıktığı görülmektedir (Seymen ve ark., 2013; Can ve ark., 2014; Seymen ve ark., 2016)

Hızla artan dünya nüfusunun besin ihtiyacını karşılamaya yönelik yeni çeşitlerin geliştirilmesinde biyoteknolojik uygulamalar bitki ıslahı açısından son derece önemli bir konu haline gelmiştir. Bitki türlerindeki genetik varyasyonun daralmasından dolayı gerekli varyasyonun köy popülasyonlarından, tescilli çeşitlerden ve yabancı akrabalarından sağlanarak, uygun genlerin biyoteknolojik uygulamalar ile kültür çeşitlerine aktarılması gerekmektedir. Klasik bitki ıslahıyla bu genlerin aktarılmasında zaman, emek, işgücü gibi birçok problemle karşılaşmaktadır. Bitki biyoteknolojisi; çeşitli doku kültürü ve genetik mühendisliği tekniklerini kullanarak bitkilerin moleküler seviyede iyileştirilmesinde kullanılan önemli araçlara sahiptir. Çok uzun yıllar sürebilen bitki ıslahı çalışmalarını kısaltmanın en önemli yollarından biri moleküler yöntemler ile olabilmektedir (OH, 1972).

Moleküler biyoloji alanındaki gelişmelerin sağladığı olanaklar sayesinde türler, çeşitler ve hatta hatlar arasındaki benzerlik oranları ve düzeyleri çeşitli markör sistemleriyle oldukça kolay tespit edilebilir duruma gelmiştir. Islah çalışmalarında morfolojik belirteçler yerlerini daha güvenilir sonuçlar veren moleküler markörlere bırakmıştır.

SSR (Simple Sequence Repeat) markörleri, ökaryotik genomlar için mükemmel bir polimorfizm kaynağıdır. Genomda en sıklıkla rastlanan markör tiplerinden biridir. Genomda dizilerin nerede bulunduğu ve ne kadar tekrarlandığı türden türe farklılık göstermektedir ve bu farklılığa göre SSR primerleri geliştirilmiştir (Devran, 2003). SSR veya mikrosatelit markörleri, popülasyon analizi için en önemli markörler arasında olup ve bitkilerde gen havuzu genotiplenmesi, genetik bağlantı ve ilişkilendirme haritalaması çalışmalarında ve markör destekli ıslah çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Ding ve ark., 2015). Kodominant özellik sergilemesi, polimorfizm oranının yüksek olması, güvenilir sonuçlar vermesinden dolayı sıklıkla kullanılan markörler tiplerinden biri olan SSR markörleri en informatif markörler arasındadır (Solmaz, 2010).

Yapılan bir çalışmada, çerezlik kabak türünün İran'da farklı bölgeler arasındaki genetik çeşitliliğini araştırmak için, 26 yerel çeşit 14 SSR markörü kullanılarak incelenmiştir (Rahim ve ark., 2013).

Bir diğer kapsamlı çalışmada 104 genotip arasında ki genetik ilişkiler, 134 SSR ve dört SCAR markörü ile genotiplenmiş olup toplam 20 ilişki grubu arasında dağılan toplam 418 allel elde edilmiştir. Temel bileşenler analizi sonucunda, kabağın alt türleri *pepo*, *texana*

ve *fraterna*' yı temsil eden 104 genotip üç ana kümeye ayrıldığı gösterilmiştir (Gong ve ark., 2012).

Bu çalışma kapsamında, çerezlik kabaklarda ümitvar olarak belirlenmiş S4 kademesine kadar kendilemeleri yapılmış 83 adet hat arasındaki genetik çeşitliliğin EST-SSR markörleri ile karakterize edilmiştir. Elde edilen alel verileri koleksiyon içerisinde ki genetik çeşitliliği ortaya koymuş olup, hibrit çeşit ıslahında kullanılacak uygun ebeveyn adayların belirlenmesinde kullanılacaktır.

MATERYAL VE METOT

Çalışmada daha önce (*Cucurbita pepo* L.), ümitvar olarak belirlenmiş S4 kademesine kadar kendilemeleri yapılmış 83 adet çerezlik kabak genotipi kullanılmıştır. Moleküler karakterizasyon için genç fide döneminde bulunan bitkilerden steril bistüri yardımıyla bitkinin sağlıklı, genç yapraklarından (yaklaşık 0, 25g) her genotipi temsil edecek şekilde beş adet bitkiden DNA izolasyonu için örnekler alınmış ve bulk yapılmıştır. Bitkilerden alınan genç yaprak örnekleri sıvı azotta ani şoklama ile dondurularak -80°C derin dondurucuda DNA izolasyonu yapılmaya kadar muhafaza edilmiştir.

Çerezlik kabak genotiplerinden DNA izolasyonu CTAB protokolüne göre gerçekleştirilmiştir (Doyle ve Doyle, 1987). Çerezlik kabak DNA örneklerinden Blanca ve ark. (2011) yılında geliştirdikleri EST-SSR markörleri çalışmada kullanılan bağlanma sıcaklıkları kullanılarak yapılmıştır. EST-SSR markörlerinin çoğaltılması için gerçekleştirilecek olan PCR reaksiyonları, BioRad PCR cihazında gerçekleştirilmiş olup. Toplam 20 µL hacimli PCR reaksiyonu için 1x AmplitaqGold® PCR Tamponu, 2.5 mM MgCl₂, 200µM her bir dNTP (Promega), 300 nM her bir primer, 0.5 ünite AmplitaqGold® polimeraz enzimi (Applied Biosystems Foster City CA), 1.0µL DNA ve nükleaz içermeyen H₂O içeren bir protokol hazırlanmıştır.

Agaroz jeli elektroforezinde PCR reaksiyonunun çalışıp çalışmadığı kontrol edildikten sonra, kabak genotiplerine ait DNA örneklerinden çoğaltılmış olan EST-SSR markörleri, Qiaxcel Fragment Analyzer (Qiagen Sample&Assay Technologies) kapiller elektroforez sistemi ile yüksek çözünürlükte görüntülenmiştir. Markör alelleri manuel olarak var/yok şeklinde skorlanıp, DarWin (<http://darwin.cirad.fr/darwin>) yazılımında NJ yöntemi kullanılarak bir genetik çeşitlilik analizi yapılmıştır.

BULGULAR

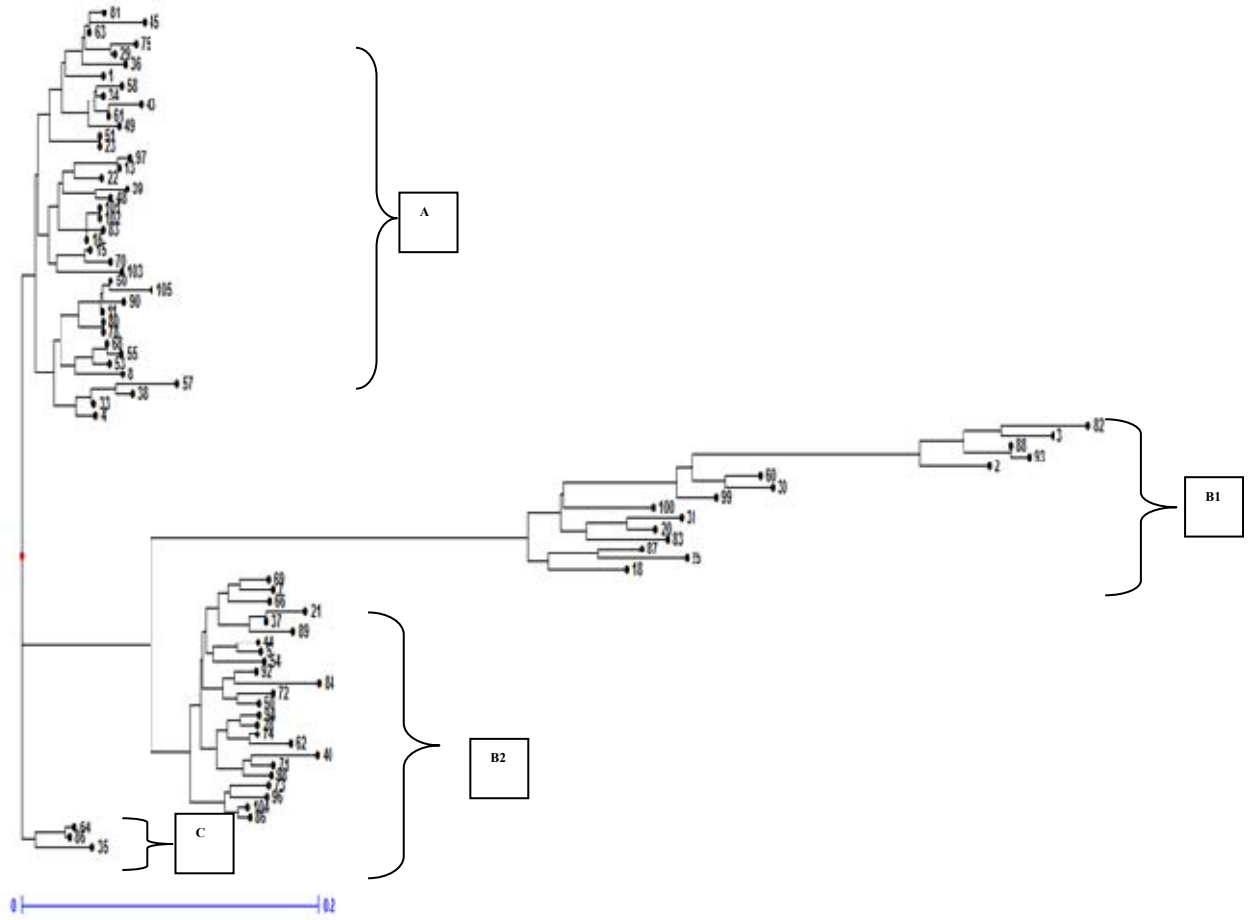
Blanca ve ark. (2011) yılında geliştirilen EST-SSR markörlerinin 31 tanesi çalışma kapsamında uygulanmıştır. Çalışma kapsamında kullanılan EST-SSR markör bilgileri Tablo 1'de verilmiştir.

Çalışma kapsamında kullanılan 83 kabak genotipinde 107 adet polimorfik SSR aleli elde edilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada Kullanılan EST-SSR markör bilgileri

Markır	Tekrar Sayısı	Allel Sayısı	Markır	Tekrar Sayısı	Allel Sayısı
CUTC001906	7	2	CUTC018879	7	2
CUTC002749	10	4	CUTC020992	10	4
CUTC004158	7	2	CUTC022867	8	2
CUTC004307	8	2	CUTC023363	7	3
CUTC004399	7	3	CUTC046645	9	2
CUTC004782	6	3	CUTC000906	12	2
CUTC004991	7	3	CUTC000913	9	1
CUTC005739	8	2	CUTC000922	10	1
CUTC005800	11	5	CUTC000933	8	1
CUTC006209	9	3	CUTC001016	10	2
CUTC006703	7	1	CUTC001032	6	1
CUTC006891	12	2	CUTC001044	6	1
CUTC007942	8	3	CUTC001051	35	2
CUTC008357	8	3	CUTC001060	5	1
CUTC008409	8	2	CUTC001075	7	1
CUTC008419	7	1	CUTC001088	10	1
CUTC008659	7	1	CUTC001127	13	1
CUTC009316	7	3	CUTC001131	15	2
CUTC009607	11	4	CUTC001137	7	2
CUTC009760	7	3	CUTC001156	7	2
CUTC010796	8	1	CUTC001186	11	3
CUTC011336	9	3	CUTC001231	6	1
CUTC012342	7	3	CUTC001239	13	1
CUTC015525	7	1	CUTC001251	8	3
CUTC017708	8	2	CUTC001261	10	2
			CUTC001273	6	1

Çalışılan kabak genotipleri arasındaki moleküler genetik çeşitlilik unweighted Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılarak belirlenmiş ve oluşturulan dendrogram aşağıda gösterilmiştir.



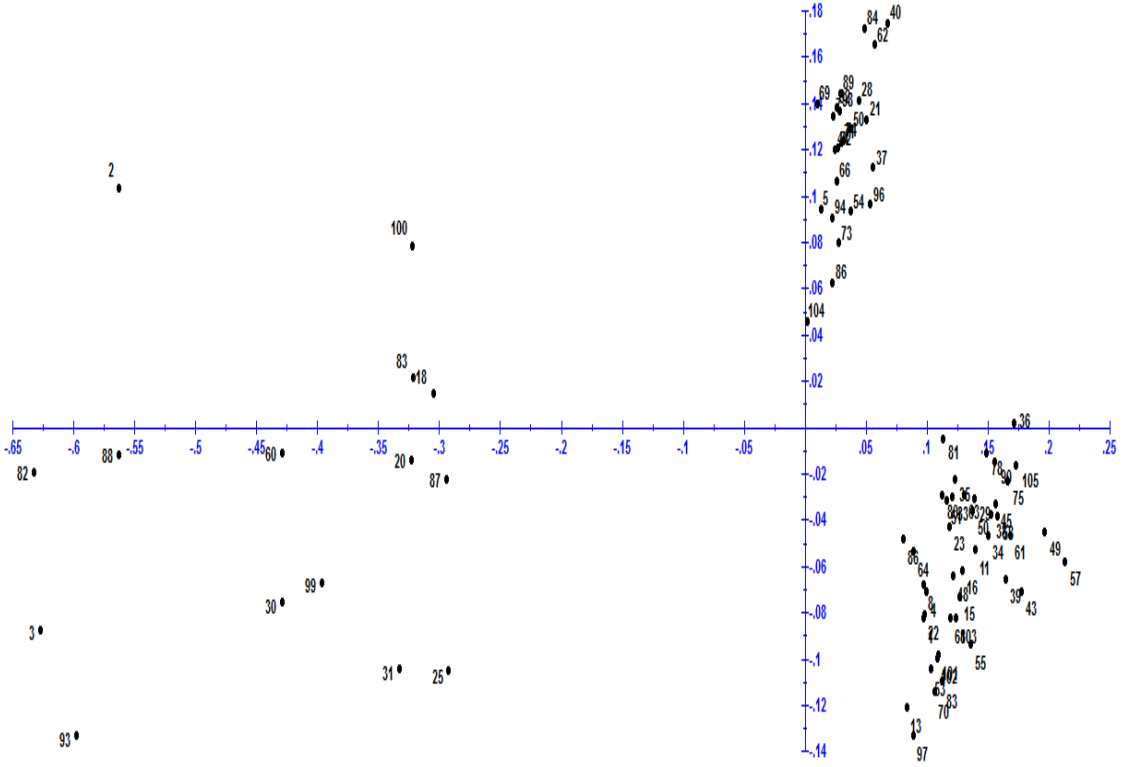
Şekil 1. Unweighted Neighbor-joining yöntemi ile çizilmiş genetik çeşitlilik analizi sonucunu gösterir dendrogram.

EST-SSR alel verileri ile gerçekleştirilen çeşitlilik analizi sonucunda oluşturulan çeşitlilik kabak genotipleri arasındaki moleküler genetik ilişkileri gösteren NJ dendrogramı, kabak genotiplerinin üç ana kümeden oluşan dört grupta toplandığını göstermektedir (Şekil 1). Uzaklık matrisi ve NJ dendrogramı arasındaki korelasyon, Mantel testi sonucu ile ortaya konmuş olup yüksek düzeyde korelasyon göstermektedir ($r = 0.99$). Çalışma kapsamında kullanılan markörlere ait PIC değeri hesaplanmış olup en yüksek PIC değerine sahip markörün 0.42 değeri ile CUTC006209 olduğu görülmüştür.

Genotiplerin 41 tanesi A grubunda toplanmış olup, B Grubu 39, D grubu ise 3 genotipten oluşmuştur. Genotipler arasındaki ortalama benzemezlik değeri, 0.28 bulunmuş

olup, analiz edilen genotipler arasındaki moleküler genetik çeşitliliğinin düşük olduğunu göstermektedir.

Factorial analysis: Axes 1 / 2



Şekil 2. SSR Alel verileri kullanılarak oluşturulan Temel Bileşen Analizi (PCA) grafiği.

SSR markör analizleri ile elde edilen veriler çerezlik kabak genotipleri arasındaki moleküler genetik ilişkilerin belirlenmesinde kullanılmış ve genel olarak koleksiyonun gösterdiği çeşitlilik düzeyi ile birlikte genotiplerin birbiri ile moleküler genetik yakınlık durumları belirlenmiştir.

PCA, çerezlik kabak genotiplerinin çeşitlilik ve ıslah çalışmaları için basitleştirilmiş bir sınıflandırmasını sağlamıştır. PCA grafiği, ölçülen değişkenler bakımından tablo içinde genotipler arasındaki benzerlikleri yansıtan geometrik mesafeleri göstermektedir. Kümeleme analizi incelendiğinde; genotiplerin iki gruba ayrıldığı görülmüştür. 1. grup PCA 1 ve PCA 2'de pozitif değerde ayrılmıştır. İkinci grup ise PCA1 pozitif ekseninde ve PCA 2 ekseninde negatif değerde ayrılmıştır. Sonuçlara göre 2, 3, 100, 83, 18, 88, 60, 20, 87, 93, 30, 99, 31 ve 25 numaralı genotiplerin anaç olarak kullanılabilmesi ve bu genotip kombinasyonları ile melez azmanlığının yüksek ihtimal ile yakalanacağı öngörülmektedir.

SONUÇ

Çerezlik kabak genotipler arasındaki genetik çeşitliliğin belirlenmesinde 31 adet EST-SSR markörü kullanılmıştır. EST-SSR markörlerinin çalışma kapsamında kullanılmak üzere seçilmesinin temel sebebi, bu markör tipinin genomun ifadelenen bölgelerinden üretilmiş olması ve bu genomik bölgelerde gözlemlenecek polimorfizimlerin fenotipe yansıma ve çalışılan popülasyon içerisindeki genetik çeşitliliği yansıtmada daha gerçekçi bir sonuç vereceği düşünülmektedir. Protein kodlamayan genomik bölgelerden üretilen markörler ile gerçekleştirilen çeşitlilik analizi çalışmalarının popülasyondaki genetik çeşitliliği olduğundan daha yüksek gösterme potansiyelinin yüksek olduğu zira bu tarz genomik lokuslardaki mutasyonları fenotipe etki etmeme olasılığının yüksek oluşu, hesaplanan genetik farklılıkların gerçek çeşitlilikten çok daha yüksek olacağı yönündeki verilerdir. Çalışma kapsamında moleküler genetik verilere dayanarak hesaplanan genetik ilişkiler, popülasyonda çeşitlilik derecesini belirleyerek gelecekteki ıslah programları için değerli bilgiler sağlayacak olduğunu ortaya koymuştur. Çalışmanın çerezlik kabakta planlanan ıslah programı için yararlı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Blanca, J., Canizares, J., Roig, C., Ziarso, P., Nuez, F. ve Pico, B., 2011, Transcriptome Characterization and High Throughput SSRs and SNPS Discovery in *Cucurbita Pepo* (Cucurbitaceae), *Bmc Genomics*, 12:104.
2. Can, H., Türkmen, Ö., Işık, R., Paksoy, M., Seymen, M., Fidan, S. ve Hakkı, E. E., 2014, Çerezlik Kabak Hatlarının Safliklarının Dominant Markör Sistemleriyle Belirlenmesi, *Uluslararası katılımlı 5. Tohumculuk Kongresi Diyarbakır*.
3. Devran, Z., 2003, Moleküler İşaretleyicilerin (Markörlerin) Dayanıklılık Islahında Kullanılması, 20, 1-6.
4. Ding, Q., Li, J., Wang, F., Zhang, Y., Li, H., Zhang, J. ve Gao Jianwei., 2015, Characterization and Development of EST-SSRs by Deep Transcriptome Sequencing in Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*), *Hindawi Publishing Corporation International Journal of Genomics*, 2015.
5. Doyle, J. J. ve Doyle, J. L., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
6. Gong, L., Paris, H. S., Stift, G., Lelley, T., Nee, M. H., Pachner, M. ve Vollmann, J., 2012, Genetic Relationships and Evolution in *Cucurbita Pepo* (Pumpkin, Squash, Gourd) as

Revealed by Simple Sequence Repeat Polymorphisms, *Theoretical and Applied Genetics*, 124, 875-891.

7. **OH, F.**, 1972, The Significance, Utilization and Conservation of Crop Genetic Resources, *FAO*, Rome.
8. **Perrier X, Jacquemoud-Collet J-P** (2006) DARwin software. <http://darwin.cirad.fr/darwin>
9. **Rahim, B., PeyvastGholamali, Ali, A. M., Babak, R., Akbar, E. A. ve Ali, B.**, 2013, Biochemical Systematic, Population Structure And Genetic Variability Studies Among Iranian *Cucurbita (Cucurbita Pepo L.)* Accessions, Using Genomic SSRS And Implications For Their Breeding Potential, *Biochemical Systematics and Ecology*, 50, 187-198.
10. **Robinson, R., Munger, H., Whitaker, T. ve Bohn, G.**, 1976, Genes of The *Cucurbitaceae*, *Hortscience*, 11, 554-568.
11. **Seymen, M., Türkmen, Ö., Paksoy, M. ve Fidan, S.**, 2012, Determination of Some Morphological Characteristics of Edible Seed Pumpkin (*Cucurbita Pepo L.*) Genotypes, *Proceedings of the Xth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae*.
12. **Seymen, M., Türkmen, Ö. ve Paksoy, M.**, 2013, Selection of edible pumpkin seeds (*Cucurbita pepo L.*) genotypes, *Journal of Selçuk University Natural and Applied Science*, 2(4), 29-39.
13. **Seymen M, Uslu N, Türkmen Ö, Juhaimi F.A ve Özcan M.M**, 2016, Chemical Compositions and Mineral Contents of Some Hull-Less Pumpkin Seed and Oils, *Journal of the American Oil Chemists*, 93, 1095-1099.
14. **Solmaz, İ.**, 2010, Bazı Karpuz Genotiplerinin SSR ve SRAP Markörleri ile Karakterizasyonu ve *Fusarium Solgunluğu (Fusarium Oxysporum F.Sp. Niveum)*'na Dayanımlarının Klasik ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması, *Çukurova Üniversitesi*, Adana.
15. **Türkmen, Ö., Uslu, N., Paksoy, M., Seymen, M., Fidan, S. ve Özcan, M. M.**, 2015, Evaluation of fatty acid composition, oil yield and total phenol content of various pumpkin seed genotypes, *La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 92, 93-97.
16. **Yavuz, D., Seymen, M., Yavuz, N. ve Türkmen, Ö.**, 2015a, Effects of irrigation interval and quantity on the yield and quality of confectionary pumpkin grown under field conditions, *Agricultural Water Management*, 159, 290-298.
17. **Yavuz, D., Yavuz, N., Seymen, M. ve Türkmen, Ö.**, 2015b, Evapotranspiration, crop coefficient and seed yield of drip irrigated pumpkin under semi-arid conditions, *Scientia Horticulturae*, 197 (33-40).