

## **Bazı çerezlik kabak hatlarında SSR markır analizi**

**Ömer Faruk COŞKUN<sup>1</sup>, Osman GÜLŞEN<sup>1</sup>, Akife DALDA ŞEKERCİ<sup>1</sup>, Halit YETİŞİR<sup>1</sup>, Hasan PINAR<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Erciyes Üniversitesi, Seyrani Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, KAYSERİ

Alınış tarihi: 14 Ekim 2016, Kabul tarihi: 4 Aralık 2016

Sorumlu yazar: Ömer Faruk COŞKUN, e-posta:ofcoskun1@hotmail.com

### **Öz**

Bu çalışmada farklı kabak genotiplerinde çalışabilecek SSR primer kombinasyonlarını belirlemek amaçlanmıştır. Çalışmada agronomik özellikler bakımından seçilen 47 çerezlik kabak genotipinde daha önce çeşitli kabakgil türlerinde geliştirilen toplam 79 SSR primer kombinasyonu test edilmiştir. Farklı genotiplerin DNA'larının karıştırılmasıyla elde edilen DNA, bütün primerlerle test edilmiştir. Bütün primerlerden 16 adedinin güvenilir bant verdiği belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular başarılı bulunan primerlerin ilişki haritalaması, safiyet testlemesi ve yeni markır geliştirme çalışmalarında kullanılabileceğini göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** Çerezlik kabak, SSR, moleküler karakterizasyon

### **SSR marker analysis at some seed pumkin lines**

#### **Abstract**

In this study, it was aimed to determine usfull SSR primer combinations at different seed pumkin genotypes. It was tested total 79 SSR primer combinations which developed for cucurbitacia species by some researches with provious studies using 47 seed pumkin genotypes selected as agronomic features. Firstly, all primer pairs were tested using mixed DNA of all genotypes and determined 16 primer pairs as reliable and usfull. Obtained results showed from this study that this markers can use for linkage mapping, seed purity testing and new marker development.

**Key words:** Seed pumkin, SSR, molecular characterization

### **Giriş**

Kabak, Cucurbitaceae ailesinin Cucurbita cinsi içerisinde bulunan önemli sebzelerinden birisidir. Kabakgiller familyasındaki sebzelerin yetiştiriciliği, ülkemizdeki koşulların elverişli olması dolayısıyla yaygın olarak yapılmaktadır. Türkiye'de 2015 yılı verilerine göre toplam 354.535 ton'luk kabak üretimi yapılmaktadır. (TÜİK, 2015). Ülkemizde çekirdek kabağı yetiştiriciliği, Nevşehir, Aksaray ve Kayseri illerinde; Ankara'nın Polatlı ilçesi civarında ve Trakya'da yoğunlaşmıştır.

Olgunlaşmamış ve olgunlaşmış kabak meyveleri insan beslenmesinde kullanılmaktadır. Bunun yanında kabak tohumları gıda ve ilaç sanayinde değerlendirilmekte (Robinson ve Decker-Walters, 1997) ve besleyici değeri yüksek olduğu için çerezlik olarak faydalanılmaktadır. Kabak çekirdekleri, protein depolayan bitkilerin en önemli temsilcilerinden biridir (Blagrove ve Lilley, 1980; Marcone, 1999). Doymamış yağ asitlerinden Oleik ve Linoleik asit bakımından zengindirler ve kolesterol düşürücü etkisi bulunan Squalene maddesi içermektedirler (Ermış, 2010).

Bitkiler üzerinde çeşitli moleküler markır yöntemleri kullanılarak genetik çeşitlilik çalışmaları yapılabilmektedir. Moleküler markırlardan biri olan SSR, 1-6 baz uzunluğunda kısa tekrar dizileridir ve "mikrosatellit" olarak adlandırılırlar. Son yıllarda yaygın bir şekilde SSR markör tekniği kullanılmaktadır. Ardışık SSR tekrarlarının sayısındaki farklılık farklı uzunlukta DNA parçalarının oluşmasına neden olmaktadır. Primer olarak SSR'ları çevreleyen korunmuş DNA dizileri kullanılarak bir lokustaki farklı alleller belirlenebilmektedir. Bitkilerde oldukça fazla bilgi veren SSR, güvenilir, polimorfizm oranı yüksek, kodominant ve tekrarlanabilirliği çok yüksek bir

markör yöntemidir. Bu tekniğin en önemli dezavantajı yeni markör geliştirilmesinin zorluğudur (Yıldırım ve Kandemir 2001). SSR markörleri bitki türlerinde populasyon analizleri, genetik haritaların oluşturulması, markör yardımıyla seleksiyon amacıyla kullanılmaktadır (Gupta ve Varshney, 2000). SSR tekniği aynı zamanda tür karmaşasının olduğu durumlarda da kullanılabilir (Nimmakayala ve ark., 2009). Cucurbita cinsi bitkileri üzerinde SSR tekniği ile yapılan genetik çeşitlilik çalışmaları bulunmaktadır (Gong ve ark., 2012; Katzir ve ark., 2000, 2002; Paris ve ark., 2003, 2004). Bu çalışmanın amacı; farklı çerezlik kabak genotiplerinde çalışabilecek SSR primer kombinasyonlarını belirlemektir.

### Materyal ve Yöntem

Çalışmada bitkisel materyal olarak Kayseri ilinden bitkisel ve meyve özellikleri dikkate alınarak seçilen toplam 47 adet kabak genotipi kullanılmıştır. Her genotipten alınan 10'ar tohum 3:1 torf:perlit ortamında çimlendirilmiş ve iki yapraklı aşamaya geldiğinde seraya transfer edilmiştir.

### DNA izolasyonu:

Serada 47 biber genotipi ekilmiş ve her genotipten taze yaprak örnekleri DNA ekstraksiyonu için liyofilize edilmiştir. Toplam genomik DNA, Doyle ve Doyle (1990) protokolüne göre elde edilmiştir. İzole edilen DNA'ların miktar ve kaliteleri, 1.5 µl DNA örneği kullanılarak spektrofotometre (Nanodrop ND-100) ile ölçülmüş ve çalışmaya uygun oldukları görülmüştür. 47 genotipin her birinden eşit miktarda karıştırılarak bulk DNA elde edilmiştir.

### PCR aşaması

PCR reaksiyonu için hacim 15 µl olarak hazırlanmıştır: 7.15 ml distile su, 1.5 ml 10 x DNA polymerase buffer, 1.2 ml dNTPs (2.5 mM each), 1 ml primer (5 mM), 0.15 ml Taq Polymerase (10 u/ml) ve 20 ng bulk DNA. Hazırlanan PCR karışımı 79 ISSR primeri kullanılarak analiz edilmiştir. Bio-Rad C1000 Thermal Cycler PCR cihazına yerleştirilip 95°C' de 5 dakika süreyle bir denatürasyon yapıldıktan sonra 45 döngü olacak şekilde 95°C' de 1 dakika, 55°C' de 30 saniye, 72°C' de 1 dakika tutulmuştur. Son olarak PCR karışımı 72°C' de 6 dakika tutularak markör çoğaltılmıştır.

### Jel Görüntüleme ve Sonuçların Değerlendirilmesi

PCR ürünleri agaroz ve akrilamid jelde ayrı ayrı koşturularak görüntülenmiştir. Bu amaçla ilk olarak

%2.5 'lik agaroz jel hazırlanmıştır. PCR reaksiyonlarından elde edilen ürünler 100 bp plus DNA büyüklük markörüyle birlikte agaroz jelde ve TBE tampon solüsyonu içerisinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılmıştır. Daha sonra ethidium bromide ile boyanıp, jel görüntüleme sisteminde ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir. Akrilamid jelde yürütmek için ise PCR ürünleri Li-Cor jel sisteminde görüntülenmiştir. PCR ürünleri %6.5'luk poliakrilamid jelde koşturulmuştur. Jel hazırlandıktan sonra 2 saat polimerizasyonu beklenmiştir. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra Li-Cor DNA Analyzer 4300 cihazında formamid yükleme tamponu ile 1000 V, 35 mA, 25 W 45°C'de 15 dk. ön ısıtma yapılmıştır. Amplifikasyon ürünü içeren her bir tüpün içerisine formamid yükleme solüsyonu eklenmiş ve örnekler PCR'da 95°C de 5 dk. denatüre edilmiştir. Denatürasyon işlemi tamamlandıktan sonra örnekler buz içerisine alınmış ve her bir örnekten 1.0 µl poliakrilamid jele yüklenmiştir.

Elektroforez ve görüntüleme işlemleri sonucunda elde edilen görüntüler incelenmiştir. Güvenilir bant verdiği belirlenen primerler kaydedilmiştir.

### Bulgular ve Tartışma

İzole edilen DNA'ların miktar ve kaliteleri, 1.5 µl DNA örneği kullanılarak spektrofotometre (Nanodrop ND-100) ile ölçülmüştür (Çizelge 1). 79 primer ile yapılan primer testi sonuçlarına göre güvenilir bant verdiği tespit edilen 16 primer belirlenmiştir (Çizelge 2). SSR analizi için Danin-Poleg (2001) geliştirdiği primerlerden 5 adedi, Watcharawongpoiboon ve Chungwongse (2008) geliştirdiği 8 primer ve Jarret ve ark. (1997)' nin geliştirdiği primerden 3 adedi olmak üzere toplam geliştirilen SSR primerlerinden 16 tanesinin kullanılabilmesi belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan primerlerin özellikleri Tablo 2'de verilmiştir.

Kabakta ve diğer *Cucurbitaceae* türlerinde SSR markörlerinin kullanıldığı farklı çalışmalarda bu sayı ile uyumlu değerler bulunmaktadır. Tzitzikas ve ark. (2009), az sayıda SSR primer kullanılması durumunda bile test edilen genotipleri birbirinden ayırabileceğini bildirmişlerdir. Staub ve ark. (2000) 46 genotip arasındaki genetik çeşitliliği 17 primerle araştırmışlardır. López-Sesé ve ark. (2002) 15 adet İspanyol kavun genotipinde 12 primer, Paris ve ark. (2003) 45 adet kabak genotipinde 7 primer, 22 farklı

*Cucumis* genotipinde Zhuang ve ark. (2004) 15 primer, Szabó ve ark. (2005) 47 Macar kavun genotipinde 20 primer kullanarak çalışmalarını yapmışlardır. Farklı *Cucurbitaceae* türlerinde yapılan bu moleküler karakterizasyon çalışmalarında

belirlediğimiz primer sayısına (16 adet) benzer sayıda SSR primerlerinin kullanıldığı ve başarılı sonuçlar alındığı bildirilmiştir. Bu çalışma sonucunda başarılı bulunan primerler, ilişki haritalaması, safiyet testlemesi ve yeni markır geliştirme çalışmalarında kullanılabilir.

Çizelge 1. DNA miktarı ve kalite ölçümleri

Genotip	DNA Miktarı (ng/μl)	DNA Kalitesi	Genotip	DNA Miktarı (ng/μl)	DNA Kalitesi	Genotip	DNA Miktarı (ng/μl)	DNA Kalitesi	Genotip	DNA Miktarı (ng/μl)	DNA Kalitesi
1	161.3	2.01	13	80.6	2.04	25	429.7	2.05	37	162.4	1.75
2	1197.1	2.08	14	66.4	2.01	26	138.7	1.93	38	105	1.82
3	88.6	2.04	15	135.4	2.01	27	25.1	2.09	39	550	2.07
4	213.8	1.95	16	318.2	2.1	28	19.3	2.04	40	322.2	2.01
5	148.7	1.96	17	452.7	2.02	29	39.5	1.95	41	15.8	2.05
6	317.9	1.94	18	240.3	2.08	30	53.9	2.08	42	61.3	1.63
7	24.2	1.95	19	396.4	2.05	31	54.7	2.15	43	22.5	2.05
8	156.4	2.01	20	622.3	2.08	32	52.8	1.97	44	17.6	2.02
9	401.8	2.02	21	104.2	2.0	33	33.3	1.99	45	110.1	2.06
10	367.1	2.02	22	19.3	1.91	34	299.2	2.08	46	19.3	1.97
11	98.1	1.74	23	128.1	1.82	35	219.7	1.91	47	21.5	2.05
12	496.4	1.95	24	178.4	1.86	36	139.8	1.95			

Çizelge 2: Çalışan SSR primerlerinin sekans bilgileri

	Sekans Adı (F: ileri; R: geri)	Primer Sekansı (5'-3')	Kaynak	Bant Büyüklüğü	Yapışma Sıcaklığı °C
1	CSTCC813F-700	GTTGTGCTCCCAATAGTTG	Danin- Poleg, 2001	205	55
	CSTCC813R-700	CACCACTTCTTCCACCGAA			
2	CSJCT14F-800	TTCCACGTTACATTGGACGA	Watcharawongpoiboon ve Chungwongse, 2008	190	55
	CSJCT14R-800	AGAATTCATGGCCTGCAGAT			
3	CSCCT571F-800	CCTTTCTGCTGTTTCTTCTTC	Danin- Poleg, 2001	220	53
	CSCCT571R-800	GAAGGAAGGAGTGAGGGGAAG			
4	CSJCT 191F-800	ACAATGGCAGGTCAATTAGC	Watcharawongpoiboon ve Chungwongse, 2008	205	53
	CSJCT 191R-800	CCTGGGTTGTATCGAAGAC			
5	CSTA050F-800	GAATTATGCAGATGGGTCTT	Danin- Poleg, 2001	146	52
	CSTA050R-800	CAAGAAGATCAAATGATAGC			
6	CSJCT 216F-800	CAGTAGGAGGAAGTGGGTTC	Watcharawongpoiboon ve Chungwongse, 2008	270	54
	CSJCT 216R-800	CTTACTCCAACCAACCCAAC			
7	CMCTT144F-700	CAAAAGGTTTCGATTGGTGGG	Danin- Poleg, 2001	146	56
	CMCTT144R-700	AAATGGTGGGGTTGAATAGG			
8	CMTC51F-700	ATTGGGTTTCTTTGAGGTGA	Danin- Poleg, 2001	205	55
	CMTC51R-700	CCATGTCTAAAAACTCATGTGG			
9	CSJCT 71F-800	AATTCCATGGACATCCAGCCGAAG	Watcharawongpoiboon ve Chungwongse, 2008	245	54
	CSJCT 71R-800	CAGTGAAAGGCACTAAAGCGGAAG			
10	CSJCT 252F-800	GATGGTGGAGATGGAATTGGGACT	Watcharawongpoiboon ve Chungwongse, 2008	300	53
	CSJCT 252R-800	TTAGAGCTGGAACCTCTCCGCAAC			
11	CI.1-06F-800	CACCTCCTCCAGTTGTCATTTCG	Jarret ve Ark., 1997	155	53
	CI.1-06R-800	AAGGTCAGCAAAGCGGCATAGG			
12	CI.1-120F-800	CGCGCGTGAGGACCCTATA	Jarret ve Ark., 1997	190	53
	CI.1-120R-800	AGCAATTGATTGAGCGGTTCT			
13	CSJCT 656F-800	TCCTACAACCTCAAAGGCCAAC	Watcharawongpoiboon ve Chungwongse, 2008	200	52
	CSJCT 656R-800	GAAGTGGAGTGGAGTGGAGTGA			
14	CI.2-23F-800	GAGGCGGAGGAGTTGAGAG	Jarret ve Ark., 1997	210	56
	CI.2-23R-800	ACAAAACAACGAAACCCATAGC			
15	CSJCT 662F-800	ACGTCGTAACCATCGGAGTC	Watcharawongpoiboon ve Chungwongse, 2008	95	53
	CSJCT 662R-800	GCTTCCAAGCGTCAAAGGTATC			
16	CSJCT 664F-800	AAGTGGGCTCGATTGGAAGA	Watcharawongpoiboon ve Chungwongse, 2008	155	53
	CSJCT 664R-800	CCGTCGCCTTCTCAAGTTC			

## Sonuç ve Öneriler

Bu çalışma sonucunda başarılı bulunan primerler, ilişki haritalaması, safiyet testlemesi ve yeni markır geliştirme çalışmalarında kullanılabilir olacaktır.

## Kaynaklar

- Blagrove, R., Lilley, G. 1980. Characterisation of cucurbitin from various species of the Cucurbitaceae. *European Journal of Biochemistry*, 103: 577-584.
- Danin-Poleg, Y., Reis, N., Tzuri, G., Katzir, N. 2001. Development and characterization of microsatellite markers in *Cucumis*. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 61-72.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1990. Isolation of Plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12: 13-15.
- Ermış, S. 2010. Ekolojinin kabuklu ve kabuksuz çekirdek kabak (*Cucurbita pepo* L.) hatlarında tohum verimi ve çerezlik kalitesine etkisi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara, 153 s. (Basılmamış Doktora Tezi).
- Gong, L., Paris, H.S., Nee, M.H., Stift, G., Pachner, M., Vollmann, J., Lelley, T., 2012. Genetic relationships and evolution in *Cucurbita pepo* (pumpkin, squash, gourd) as revealed by simple sequence repeat polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.*, 124: 875-891.
- Gupta, P.K., Varshney, R.K. 2000. The Development and Use of Microsatellite Markers for Genetic Analysis and Plant Breeding with Emphasis on Bread Wheat. *Euphytica*, 163-185.
- Jarret, R.L., Merrick, L.C., Holms, T., Evans, J., Aradhya, M.K. 1997. Simple Sequence Repeats in Watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai). *Genome*, 40(4): 433-441.
- Katzir, N., Portnoy, V., Yonash, N., Mozes-Daube, N., Tzuri, G., Paris, H.S. 2002. Use of AFLP, ISSR, and SSR marker systems to assess genetic diversity in *Cucurbita pepo*. In: *Plant, Animal and Microbe Genomes Conference X*, vol. 10, San Diego, California, 121p.
- Katzir, N., Tadmor, Y., Tzuri, G., Leshzashen, E., Mozes-Daube, N., Danin-Poleg, Y., Paris, H.S. 2000. Further ISSR and preliminary SSR analysis of relationships among accessions of *Cucurbita pepo*. In: Katzir, N., Paris, H.S. (Eds.), *Proc Cucurbitaceae 2000*. *Acta Hort.*, 510: 433-439.
- López-Sesé, A.I., Staub, J., Katzir, N., Gómez-Guillamón, L.S. 2002. Estimation of Between and Within Accession Variation in Selected Spanish Melon Germplasm Using RAPD and SSR Markers to Assess Strategies for Large Collection Evaluation. *Euphytica*, 127: 41-51.
- Marcone, M. 1999. Biochemical and biophysical properties of plant storage proteins: a current understanding with emphasis on 11S seed globulins. *Food Research International*, 32: 79-92.
- Nimmakayala, P., Tomason, R.Y., Jeong, J., Ponniah, K.S., Karunathilake, A., Levi, A., Perumal, R., Reddy, K.U. 2009. Genetic Reticulation and Interrelationships Among *Citrullus* Species as Revealed by Joint Analysis of Shared AFLPs and Species-Specific SSR Alleles. *Plant Genetic Resources Characterization and Utilization*, 1-10.
- Paris, H.S., Yonah, N., Portnoy, V., Mozes-Dauble, N., Tzuri, N., Katzir, N. 2003. Assessment of genetic relationships in *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*) using DNA markers. *Theor. Appl. Genet.*, 106:971-978.
- Paris, H.S. 2004. AFLP, ISSR, and SSR polymorphisms are in accordance with botanical and cultivated plant taxonomies of the highly polymorphic *Cucurbita pepo*. *Acta Hort.*, 634:167-171.
- Robinson, R.W., Decker-Walters, D.S. 1997. Cucurbits. In: *Crop Production Department of Horticultural Science*. Cornell Univ., The Cucurbit Network U.S.A
- Staub, J.E., Danin-Poleg, Y., Fazio, G., Horejsi, T., Reis, N., Katzir, N. 2000. Comparative Analysis of Cultivated Melon Groups (*Cucumis melo* L.) Using Random Amplified Polymorphic DNA and Simple Sequence Repeat Markers. *Euphytica*, 115: 225-241.
- Szabó, Z., Gyulai, G., Humphreys, M., Horváth, L., Bittansánszky, A., Lágler, R., Heszky, L. 2005. Genetic Variation of Melon (*C. melo*) Compared to an Extinct Landrace from the Middle Ages (Hungary).I. rDNA, SSR and SNP Analysis of 47 Cultivars. *Euphytica*, 146: 87-94.
- Tzitzikas, E.M., Monforte, A.J., Fatihi, A., Kyriotakis, A., Iacovides, T.A., Ioannides, I.M., Kalaitzis, P. 2009. Genetic Diversity and Population Structure of Traditional Greek and Cypriot Melon Cultigens (*Cucumis melo* L.) Based on Simple Sequence Repeat Variability. *HortScience*, 44(7): 1820-1824.
- TÜİK, 2015. Türkiye İstatistik Kurumu bitkisel üretim veritabanları. <http://tuikapp.tuik.gov.tr>.

- Watcharawongpaibon, N., Chunwongse, J. 2008. Development and Characterization of Microsatellite Markers from an Enriched Genomic Library of Cucumber (*Cucumis sativus*). Plant Breeding, 127: 74-81.
- Yıldırım, A., Kandemir, N. 2001. Genetik markörler ve analiz metodları. Bitki biyoteknolojisi II Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, Ed: Özcan S, Gürel E, Babaoğlu M., Selçuk Üniversitesi Basımevi.