

SSR MARKÖR SİTEMİ KULLANARAK KAVUNLARDA SAFLIK DÜZEYLERİNİN TAHMİN EDİLMESİ

Necibe KAYAK¹, Ali Tevfik UNCU², Önder TÜRKMEN³

¹Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Konya; ORCID: 0000-0001-7104-8544

²Necmettin Erbakan Üniversitesi, Moleküler Biyoloji Bölümü, Konya; ORCID: 0000-0003-4729-5750

³Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Konya; ORCID: 0000-0003-3218-6551

Geliş Tarihi / Received: 24.11.2019

Kabul Tarihi / Accepted: 30.01.2020

ÖZ

Kavun çok çeşitli alt türleri içermesi ve ekonomik değerinden dolayı *Cucurbitaceae* familyası içinde önemli bir sebze türüdür. Türkiye’de kavun üretimi, yerel popülasyonlar, standart ve F₁ çeşitler ile yapılmaktadır. Türkiye’de kavunda genetik çeşitlilik oldukça fazladır. Bunun başlıca nedeni bitkinin çiçek yapısı ve döllenme biyolojisidir. Bu da ıslahçılar için çok önemli avantajlar sağlamaktadır. Ancak bu çeşitlilikten yararlanarak yeni çeşitlerin eldesinde önce bu hat ve/veya popülasyonların saflaştırılması gerekmektedir. Bunun içinde uzun süre isteyen emek yoğun çalışmalar gerekmektedir. Bitkilerde saflık düzeylerin erken ve pratik bir yöntemle belirlenebilmesi ıslahçılara önemli avantajlar sağlayacaktır. Bu bağlamda ilgili moleküler markör kullanımı daha etkin saflık düzeylerinin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Bu çalışmada SSR markör yöntemi kullanılarak kavunlarda saflık düzeylerinin tahmin edilmesi amacıyla 300 adet kavun genotipinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 26 adet SSR markörü test edilmiş en yüksek polimorfizm oranı gösteren 10 SSR markörü kullanılmıştır. Kavun genotipleri arasındaki saflık düzeyleri SSR markör yöntemiyle belirlenmiştir. Değerlendirme sonucunda en yüksek safiyet oranı %80-85, en düşük safiyet oranı %55-60 olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Kavun, safiyet düzeyi, SSR

ESTIMATION OF HOMOGENEITY LEVELS IN MELONS USING SSR MARKER SYSTEM

ABSTRACT

Melon is an important vegetable species in the *Cucurbitaceae* family due to its economic value and a wide variety of sub-species. Melon production in Turkey, local populations, and F₁ are made with standard cultivars. In Turkey, there is a lot of genetic diversity in melons. The main reason for this is the plant’s flower structure and fertilization biology. This provides very important advantages for breeding. However, by taking advantage of this diversity, this line and/or populations need to be homogenized first in order to obtain new cultivars. This requires long-term labor-intensive work. Determination of homogeneity levels in plants by an early and practical method will provide important advantages to the breeding. In this context, the use of related molecular markers is used to define more effective purity levels. In this study, 300 melon genotypes were performed to estimate purity levels in melons using the SSR marker method. In the study, 26 SSR markers were used, with 10 SSR markers showing the highest polymorphism rate tested. Purity levels between melon genotypes were determined by SSR marker method. As a result of the evaluation, the highest purity rate was 80-85% and the lowest purity rate was 55-60%.

Keywords: Melon, purity level, SSR

GİRİŞ

Kavun (*Cucumis melo* L.) *Cucurbitaceae* familyasında 2n=24 kromozoma sahip dünyada geniş bir alanda yetiştiriciliği yapılan ve ekonomik önemi olan bir sebze türüdür. Kavunun gen merkezi hakkında kesin bir bilgi olmamakla birlikte Afrika olarak kabul edilmektedir. Bununla beraber; Türkiye, İran, Hindistan, Afganistan, Çin

gibi Asya kıtasında bulunan ülkeler kavunun ikincil gen merkezidir. Ülkemizde özellikle Doğu Anadolu bölgesinin ve Van yöresinin önemli bir mikro gen merkezi olduğu bilinmektedir [11]. Kavun (*Cucumis melo* L.) hem bitkisel hem de meyve özellikleri değişkenlik gösteren oldukça polimorfik bir türdür [11, 9]. Morfolojik karakterlerle yüksek polimorfizm gösteren kavun çeşitlerinde tanımlanma zor ve karmaşık

¹Sorumlu yazar / Corresponding author: necibe.kayak@gmail.com

olmaktadır. Kavun, yabancı tozlanma özelliğine sahip olmasından dolayı yüksek polimorfizm ortaya koymaktadır [4]. Hibrit tohum üretimi sürecinde; andromonoik çiçeklerin zamansız emaskulasyonu nedeniyle tohumlar genellikle yabancı toz ile tozlanmakta ve sonuçta kavunlarda genetik açılımlar ve karışımlar meydana gelmektedir. Kavunda hibrit tohum üretiminde saf ebeveynlerin kullanılması son derece önem arz etmektedir. Genetik açıdan saf olmayan ebeveynlerin hibrit tohum üretiminde kullanılması sakıncalıdır. Saflık düzeylerini tahmin etmenin pratik bir yolu bulunmamaktadır ve ancak arazide bitkiler arasındaki morfolojik özellikleri incelenerek genetik açılım olup olmadığı anlaşılabilmektedir [1].

Son yıllarda, bahçe bitkileri ürünlerinin geniş bir bölümünde genetik yapıların belirlenmesi veya tanımlanması üzerine yoğunlaşan çalışmalar, biyoteknoloji alanı içerisinde yerini almıştır. Bugün ulaşılan teknikler, geçmişe nazaran genetik yapıların değerlendirilmeleri açısından daha net sonuçlara götürebilmektedir. PCR'a dayalı markör teknolojileri, yabancı türler, yerel çeşitler, özel bitki genotipindeki genetik çeşitliliğin değerlendirilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır [2]. Basit dizi tekrarı (SSR) gibi polimeraz zincir reaksiyon teknolojileri, tohumları ve genç yaprakları kullanarak çeşitleri kolayca ve hızlı bir şekilde tanımlar. SSR markörleri, geniş bir uygulama yelpazesi ile güçlü bir araç olduğunu kanıtlamış, ko-dominant özellik sergilemesi, polimorfizm oranının yüksek olması, güvenilir sonuçlar vermesinden dolayı sıklıkla kullanılan markörler arasındadır [6].

Aslan [1], yaptığı çalışmada S₁, S₂, S₃ ve S₀ kademesindeki kabakların ISSR ve SSR markörleri kullanarak saflık düzeyleri ile heterozigotluk arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Çalışmada 18 SSR ve 8 ISSR primer çifti kullanılmış. SSR analizleri sonucunda CMTm66 ve CMTp182 primerlerinde en yüksek ortalama PIC değeri 0,9 ve gen çeşitliliği 0,10 olarak bulunmuştur. ISSR analizleri sonucunda HVH(TCC)7, HVH(CA)7T ve BDB(CA)7C primerlerinde en yüksek ortalama PIC değeri 0,4 bulunmuştur. Ju-Fen ve ark. [5] yaptıkları çalışmada; iki F₁ kavun melezinde (Dongfangmi 1 ve Dongfangmi 2) basit dizi tekrarı (SSR) markörlerine dayanan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile saflık düzeylerini incelemiştir. "Dongfangmi 1" için 12 adet SSR primeri ve "Dongfangmi 2" için 3 çift primer çifti kullanmışlardır. Elde edilen veriler ile arazi

gözlemleri arasında uyumlu olduklarını gözlemlemişlerdir. Türkmen ve ark. [12], yaptıkları çalışmada Çumra-Konya'dan toplanan 32 kavun genotipi arasındaki genetik ilişkiyi ISSR markörü kullanarak testlemeleri yapılan 10 polimorfik primer ile belirlemişlerdir. Bu çalışmada kavun genotipleri için genetik varyasyon tahminlerini H=0.27, I=0.43 olarak bulmuşlardır.

Bu çalışmada moleküler markörler yardımıyla kendilemeleri yapılmış 300 adet kavun genotipinin kodominat bir markör sistemi olan basit dizi tekrarı (SSR) kullanarak saflık düzeyleri arasındaki ilişkiye bakılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Çalışma, Necmettin Erbakan Üniversitesi Moleküler Biyoloji Bölümü Laboratuvarında gerçekleştirilmiş olup, Konya Gıda Tarım Üniversitesi seralarında yetiştirilen 300 adet kavun bitkileri kullanarak yürütülmüştür. Deneme Konya Gıda Tarım Üniversitesi seralarında tohum ekimi ile başlamıştır. Moleküler çalışmalar için bitkiler fide döneminde iken genç yapraklardan her genotipten ayrı olarak yaprak örneği alınmış ve bitkilerin izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon işlemi DNeasy Plant Mini Kit (250) (Qiagen, 2000) [10] kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu için her bir bitki doku örneği için 100 mg çözelti hacimde kullanıldı. 1.5 mL'lik bir reaksiyon tüpüne alınan genç yaprak örnekleri kit ile birlikte verilen protokol izlenerek DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada 26 adet SSR markörü (Çizelge 1) test edilmiş en yüksek polimorfizm oranı gösteren 10 SSR markörü kullanılmıştır. PCR çalışmaları 1 ml (100 ng) içeren toplam 25 ml'lik bir hacimde gerçekleştirildi. DNA, 2.5 ml 10xTaq DNA polimeraz reaksiyon tamponu, 2.0 ml MgCl₂ (25 mmol/l), 0.5 ml dNTP'ler (her biri 10 mmol/l), her ileri ve geri primerden 0.5 ml (10 mmol/l). Tüpler buz üzerinde soğutulduktan sonra, 0.4 ml Taq DNA polimeraz (2.5 U/ml) ilave edildi ve reaksiyonlar, 94°C'de 30 saniye boyunca 35 kez, 47 ila 56°C'de 30 saniye boyunca ve 72°C'de 30 saniye boyunca döngüye alınmıştır ve son döngü, 72°C'de uzatma süresi 5 dakikaya yükseltilmiştir. Kavun genotiplerine ait DNA örneklerinden çoğaltılmış olan SSR markörleri, Qiaxcel Fragment Analyzer (Qiagen Sample & Assay

Technologies) kapiler elektroforez sistemi ile görüntülenmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Sonuç olarak test edilen 26 SSR primer çiftinin 10 tanesi kavun genotipine uygulanabilir bulunmuştur. SSR primer testi sonucunda en belirgin bantları veren ve yüksek polimorfizm gösteren primerler çalışılmıştır. Bu primerler; DM0073, CMCT505, CMCTN4, DM0298, CMCTN2, CMBR002, CMTCN41, DE1295, CMMS30_3, CMTCN30'dir. Genotiplerin safiyet oranları aşağıdaki Çizelge 2'de verilmiştir.

Paris [8]'in yaptığı çalışmada da 6 SSR primer çiftinden 16-30 arasında skorlanabilen bant ve 15-23 arası polimorfik bant elde edilmiştir. Çalışmamızda kavun genotiplerinde %80-85 ile %55-60 oranları arasında safiyetler elde edilmiştir. Li ve ark. [7]'de Green Angle F₁ kavun tohumunda saflığı tanımlamak için EST-SSR moleküler markörleri ile yapılan çalışmada saflık

oranları %98,4 olarak bulmuşlardır. Chengxiang ve ark. [3] yaptıkları çalışmada 2 kavun melezinin (Dongfangmi No. 1 ve 01-31) ve bunların ebeveynlerinin, F₁ hibritlerinin genetik saflığını belirlemek için polimorfik amplifikasyon profilleri veren 23 SSR primeri ile analiz edilmiş. Melezlerin ve ebeveynlerin saflıkları sırasıyla %98 ve %99 olarak bulunmuştur.

SONUÇLAR

SSR markörleri ile analiz edilen kavun genotiplerinin en yüksek safiyet oranı %80-85, en düşük safiyet oranı %55-60 olarak bulunmuştur. Çalışmada kullanılan kavun genotipleri önceden çalışılmış materyaller olup ancak kaç dönem kendileme yapıldığı bilinmiyordu, genotiplerin safiyet oranlarını görmek için SSR markör yöntemiyle tarandı. Çalışma sonunda kendilenmiş kavun genotiplerinde güvenilir bir şekilde ıslah programının sonraki aşamaları için planlanabilir veriler elde edilmiştir.

Çizelge 1. Çalışmada test edilen 26 SSR markör primer listesi

Table 1. Characteristics of the 26 SSR markers in the present study

Markör adı Maker name	İleri primer (5'-3') Forward primer (5'-3')	Geri primer (5'-3') Reverse primer (5'-3')
DM0073	CTCATCGCAAAACCATATC	AGTTTGTGGATCGTTTAGG
CMCT505	GACAGTAATCACCTCATCAAC	GGGAATGTAAATTGGATATG
CMCTN4	AAAACAAAAGCTCTCCACGA	CTTTCCTTTATTATGCCTACG
DM0298	GTTGACGTTTACTCATCC	AGTGAAAGATGGGTGCTTC
CMGAN271	CAACCCTCGAAACAAAAC	AGAGAGGGGTTTGAAGTG
CMTCN66	CTCCGATCAATTTTACATCT	GAATAAACTTGGTGTCCAAC
TJ10	ACGAGGAAAACGCAAAATCA	TGAACGTGGACGACATTTTT
DM0263	AAGCCATTGTCCCAACAG	CAGTGGTTCTGTAGCCATC
DE1368	GCGGAACCTGATTTTCTG	AATCCTCAAATACACATTTCC
CMMS2_3	ATCACCCACCCACCATGCCAAA	CCTTGAAAAACCAACATAACAC
CMCTN2	CTGAAAGCAGTTTGTGTCGA	AAAGAAGGAAGAGGCTGAGA
CMBR002	TGCAAATATTGTGAAGGCGA	AATCCCCACTTGTGGTTTG
CMTCN41	CCCCAAGATTTCGTATTAATC	TGGTAGTAGAGATGATATAC
DE1295	AAGGTCCAAACTTTGAGGG	TATGCCCAATGGTACTTCC
CMMS30_3	TTCCCAACAGCCCAACGACACACT	GAGATACAGAAACGACGACTAACCT
CMTCN30	GGAGGGAAAGGAAAGAGAGA	GGCAAGAAGATGGCAAAGAT
CMCTT144	CAAAAGGTTTCGATTGGTGGG	AAATGGTGGGGGTTGAATAGG
DE1245	GTCATCGACAAAGAAAGCC	TTTGGCTAATGTCTTACATCTTC
DE1400	AACTTTTGCTTTCCCTTCC	TGGGAATTAGGGTTAGATG
CMCTN7	AATGACACTGCCACATTCT	AGGTTTTTCAATGGAGGGGA
CMCTN71	TCAATTTTGGCCAAACAAGC	CAAGGACACAGATTTAATAC
CMTCN196	GGTCGTATGTTCTGCAGC	TAATGGTGAAGAAGATAAGG
CMTCN62	AAGATCGCCTCTATCACAG	ATTTGTACTCCCAACGCATC
CMGAN51	AAACCTTAACGATCTATTTCG	TCAAGAAGACGAACTATTC
DE1113	TTATCATTGGAAACCAAAGC	CCAACACTCTTAACCGCTC
CMBR097	ATATTGATTGCTGGGAAAGG	CTTTTTTGGCTTTATTGGGTC

Çizelge 2. Kavun genotiplerinde homojenite oranları (%)

Table 2. Homogeneity rates of melon genotypes (%)

Genotip adı Genotype name	Saflık Purity	Genotip adı Genotype name	Saflık Purity	Genotip adı Genotype name	Saflık Purity	Genotip adı Genotype name	Saflık Purity
1	%60-65	76	%70-75	152	%60-65	232	%80-85
2	%60-65	77	%70-75	153	%60-65	233	%80-85
3	%70-75	78	%70-75	154	%60-65	234	%60-65
4	%60-65	79	%70-75	155	%55-60	236	%60-65
5	%60-65	80	%70-75	156	%55-60	237	%80-85
6	%50-55	81	%70-75	157	%55-60	238	%75-80
7	%60-65	82	%70-75	158	%55-60	239	%60-65
8	%55-60	83	%60-65	159	%60-65	240	%60-65
9	%60-65	84	%60-65	160	%60-65	241	%60-65
10	%60-65	85	%60-65	161	%60-65	242	%60-65
11	%70-75	86	%60-65	162	%60-65	243	%75-80
12	%60-65	87	%60-65	163	%60-65	244	%60-65
13	%60-65	88	%60-65	164	%55-60	245	%75-80
14	%60-65	89	%60-65	165	%60-65	246	%60-65
15	%70-75	90	%60-65	166	%55-60	247	%75-80
16	%60-65	91	%60-65	167	%60-65	248	%60-65
17	%60-65	92	%60-65	168	%60-65	249	%60-65
18	%70-80	93	%60-65	169	%60-65	250	%60-65
19	%60-65	94	%60-65	170	%60-65	251	%75-80
20	%75-80	95	%75-80	171	%60-65	252	%60-65
21	%60-65	96	%60-65	172	%60-65	253	%80-85
22	%80-85	97	%60-65	173	%60-65	254	%75-80
23	%60-65	98	%60-65	174	%55-60	255	%60-65
24	%60-65	99	%75-80	175	%60-65	256	%60-65
25	%60-65	100	%75-80	176	%60-65	257	%60-65
26	%60-65	101	%60-65	177	%55-60	258	%60-65
27	%60-65	102	%60-65	178	%60-65	259	%60-65
28	%60-65	103	%75-80	180	%55-60	260	%60-65
29	%60-65	104	%75-80	181	%60-65	261	%60-65
30	%70-75	105	%60-65	183	%60-65	262	%60-65
31	%60-65	107	%60-65	184	%60-65	263	%60-65
32	%70-75	108	%75-80	185	%60-65	264	%75-80
33	%60-65	109	%60-65	188	%55-60	265	%60-65
34	%60-65	110	%75-80	189	%60-65	266	%60-65
35	%60-65	111	%60-65	190	%60-65	267	%75-80
36	%80-85	112	%60-65	191	%55-60	268	%60-65
37	%80-85	113	%75-80	192	%60-65	269	%60-65
38	%60-65	114	%60-65	193	%55-60	270	%80-85
39	%80-85	115	%75-80	194	%60-65	271	%60-65
40	%60-65	116	%60-65	195	%55-60	272	%60-65
41	%75-80	117	%75-80	196	%60-65	273	%60-65
42	%60-65	118	%60-65	197	%55-60	274	%60-65
43	%60-65	119	%75-80	198	%60-65	275	%80-85
44	%60-65	120	%60-65	199	%55-60	276	%60-65
45	%60-65	121	%60-65	200	%60-65	277	%60-65
46	%55-60	122	%75-80	201	%55-60	278	%60-65
47	%55-60	123	%60-65	202	%60-65	279	%60-65
48	%55-60	124	%75-80	203	%60-65	280	%60-65
49	%55-60	125	%60-65	204	%55-60	281	%80-85
50	%55-60	126	%60-65	205	%55-60	282	%60-65
51	%55-60	127	%75-80	206	%60-65	283	%60-65
52	%55-60	128	%60-65	207	%55-60	284	%75-80
53	%70-75	129	%60-65	208	%60-65	285	%60-65
54	%60-65	130	%75-80	209	%60-65	286	%60-65
55	%70-75	131	%75-80	210	%60-65	287	%60-65
56	%60-65	132	%60-65	211	%60-65	288	%75-80
57	%60-65	133	%60-65	212	%60-65	289	%60-65
58	%60-65	134	%60-65	213	%55-60	290	%60-65

Genotip adı Genotype name	Saflık Purity	Genotip adı Genotype name	Saflık Purity	Genotip adı Genotype name	Saflık Purity	Genotip adı Genotype name	Saflık Purity
59	%60-65	135	%75-80	214	%60-65	291	%75-80
60	%70-75	136	%60-65	215	%60-65	292	%60-65
61	%60-65	137	%75-80	216	%55-60	293	%75-80
62	%60-65	138	%60-65	217	%60-65	294	%60-65
63	%60-65	139	%75-80	218	%60-65	295	%60-65
64	%60-65	140	%75-80	219	%55-60	301	%60-65
65	%70-75	141	%75-80	220	%60-65	302	%60-65
66	%60-65	142	%60-65	221	%60-65	303	%75-80
67	%70-75	143	%75-80	222	%55-60	304	%60-65
68	%60-65	144	%60-65	223	%60-65	305	%60-65
69	%70-75	145	%60-65	224	%60-65	306	%60-65
70	%60-65	146	%75-80	225	%60-65	307	%60-65
71	%60-65	147	%60-65	226	%60-65	308	%60-65
72	%60-65	148	%75-80	227	%60-65	309	%75-80
73	%70-75	149	%75-80	228	%60-65	310	%60-65
74	%70-75	150	%75-80	229	%60-65	311	%60-65
75	%70-75	151	%75-80	230	%80-85	312	%80-85

KAYNAKLAR

- Aslan, N., 2019. Moleküler markörleri kullanarak çerezlik kabaklarda (*Cucurbita pepo* L.) saflık düzeylerinin tahmin edilmesi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Kayseri*.
- Can, H., Kal, Ü., Özyigit, İ.İ., Paksoy, M., Türkmen, Ö., 2019. Construction, characteristics and high throughput molecular screening methodologies in some special breeding populations: a horticultural perspective. *Journal of Genetics*. 86-98.
- Chengxiang, A., Lu, L., Guobin, M., Zhixin, L., 2005. Application of SSR markers in hybrid seed purity test of melon. *Acta Horticulturae* 32(5):902.
- Erdoğan, F., 2016. Göller bölgesinde yerel kavun genotiplerin toplanması ve morfolojik karakterizasyonu. *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Konya*, 137s.
- Ju-Fen, L., Guo-Bin, M., Ling, X., 2008. SSR markers for identification of purity of melon hybrids. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology* 5(3):223-229.
- Kayak, N., 2017. Çerezlik kabak genotiplerinde morfolojik ve moleküler (SSR) yöntemlerle karakterizasyon ve heterotik etkilerin belirlenmesi. *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Konya*.
- Li, O.J., Chen, X.M., Xia, P.X., Pei, Z.Y., Wang, Y., Lan, Q.K., Zhang, R.W., 2015. EST-SSR marker-based assay for purity identification of melon "Green Angle". In: *Advances in Applied Biotechnology*. Eds: Springer, pp:637-642.
- Paris, H.S., 2005. The genes of pumpkin and squash. *Hortscience* 40:1620-1630.
- Pitrat, M., Hanelt, P., Hammer, K., 2000. Some comments on infraspecific classification of cultivars of melon. 7. *Eucarpia Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding* 510:29-36.
- Qiagen, G., 2000. DNeasy plant mini kit and DNeasy plant maxi kit handbook. *Qiagen GmbH*.
- Robinson, R.W., Decker-Walters, D.S., 1997. Cucurbits in: *Crop Production Science in Horticulture Series* 0-85199-133-5, 226p.
- Türkmen, Ö., Şensoy, S., Erdinç, Ç., Paksoy, M., 2012. Determination of genetic diversity among Çumra melon genotypes by ISSR markers. *Proceedings of the 10. Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitacea, Antalya/Turkey, 15-18.10.2012*, pp:520-527.