

KAVUNDA FUSARIUM SOLGUNLUĞU HASTALIĞINA (FOM-1 VE FOM-2) DAYANIM DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ

Necibe KAYAK^{1*}, Mehmet Akif YAŞAR³, Abdurrahman YAŞAR³, Önder TÜRKMEN⁴

¹Dr., Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya; ORCID:0000-0001-7104-8544

²Ziraat Yük. Müh., Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya; ORCID: 0000-0002-6592-885X

³Ziraat Müh., Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya; ORCID: 0000-0001-9782-2032

⁴Prof. Dr., Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Konya; ORCID: 0000-0003-3218-6551

ÖZ

Melon Fusarium Wilt (MFW) olarak adı geçen *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (FOM) toprak kökenli bir patojenin sebep olduğu yüksek verim kayıplarına sebep olan bir hastalıktır. Hastalık etmeni fungusun kavun tarlalarında dört farklı ırkı (0, 1, 2 ve 1-2) tanımlanmıştır. Kavunda solgunluk hastalığına dayanıklılık FOM-1, FOM-2 genleri tarafından kontrol edilmektedir. *F.oxysporum* f.sp. *melonis* (FOM)'in 0 ve 2 numaralı ırklarına karşı FOM-1 geninin dayanıklı olduğu bildirilmiştir. FOM'ın 0 ve 1 numaralı ırklarına karşı FOM-2 geninin dirençli olduğu ortaya konmuştur. Toprak kökenli bu patojen ile mücadelede en etkili ve çevreci yol, dayanıklı çeşit kullanmaktır. Çalışmamızda daha önceki çalışmalarımız sonucunda elde edilen 5 baba hat ve 39 ana hattın melezlenmesi ile elde edilen 195 birey izolasyonu gerçekleştirilmiş ve bunların FOM-1 ve FOM-2'ye dayanımlarına bakılmıştır. Moleküler çalışmalarda ırk 1 için SB17645 ve SV01574 markörleri, ırk 2 için NBS1-CAPS ve CAPS2 markörleri kullanılmıştır. Sonuç olarak FOM-1'de; 184 adet homozigot dayanım (RR), 5 adet homozigot duyarlı (rr), FOM-2'de 129 adet homozigot dayanım (RR), 60 adet homozigot duyarlı (rr) olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*, kavun, moleküler markör, ırk

DETERMINATION OF RESISTANCE LEVEL TO FUSARIUM WILT DISEASE (FOM-1 AND FOM-2) IN MELONS

ABSTRACT

Fusarium oxysporum f.spp. *melonis* (FOM) is a disease that causes high yield losses caused by a soil-based pathogen. Four different strains (0, 1, 2 and 1-2) of the disease-causing fungus were identified in melon fields. Resistance to wilt disease in melon is controlled by FOM-1, and FOM-2 genes. *F.oxysporum* f.spp. *melonis* (FOM) has been reported to be resistant to the FOM-1 against races 0 and 2. It has been found that FOM-2 gene is resistant to the races 0 and 1 of FOM. The most effective and environmentally friendly way to combat this soil-based pathogen is to use a resistant variety. In our study, the 195 individual isolation of 5 father lines and 39 main lines were performed as a result of our previous work and were based on FOM-1 and FOM-2. In molecular studies, SB17645 and SV01574 marker for race 1, NBS1-caps and CAPS2 marker for race 2 are used. As a result, the FOM-1 was found as 184 homozygote resistant (RR), 5 homozygote sensitive (rr), and FOM-2 was found as 129 homozygote resistant (RR), 60 homozygote sensitive (rr).

Keywords: *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*, melon, molecular marker, race

GİRİŞ

Melon Fusarium Wilt (MFW) olarak adı geçen *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (FOM) toprak kökenli bir patojenin sebep olduğu yüksek verim kayıplarına sebep olan bir hastalıktır. FOM, kavunun kök boğazını veya köklerini enfekte edip, bitkinin su alımını engellemek suretiyle, bitkide solgunluk; yapraklarda sararma, kollarında solma, kök boğazına yakın yerlerde uzunlamasına nekrotik lezyonlar ve iletim demetlerinde kahverengileşme meydana getirmektedir [1]. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde çökme ve kurumalar meydana gelmektedir. Kavunda

Fusarium solgunluğu etmeni *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (FOM)'in konukçuya özelleştiği ve kavunda farklı fizyolojik ırklarının hastalık yaptığı belirtilmektedir. *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (FOM)'in kavunda 4 ırkı tespit edilmiştir: 0, 1, 2 ve 1-2. Bu ırklar iki farklı genle kontrol edilmektedir. *Fusarium*'a dayanıklılık için bu iki genin de bitkide mevcut olması gerekmektedir. *F.oxysporum* f.sp. *melonis* (FOM)'in 0 ve 2 numaralı ırklarına karşı FOM-1 geninin dayanıklı olduğu bildirilmiştir [2]. *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (FOM)'in ırklarına karşı dirençli genler belirlenmeye çalışılmıştır. FOM'ın 0 ve 1 numaralı ırklarına karşı

*Sorumlu yazar / Corresponding author:

FOM-2 geninin dirençli olduğu ortaya konmuştur [3]. Bununla birlikte ırk 1-2'ye dayanım kantitatif özellik göstermektedir [4]. Bugüne kadar, bu genler kavun ıslahında ve çeşit geliştirmede yaygın olarak kullanılmış ve modern kavun çeşitlerinin çoğuna aktarılmıştır. Dünyada hastalık ve zararın önlenmesi amacıyla her yıl tonlarca kimyasal ilaç kullanılmaktadır [5]. Kimyasallar kullanılmaksızın üretim yapılması halinde, üretim miktarında %60 hatta %100'e varan kayıp olmaktadır. Kimyasal ilaçların bilinçsiz ve kontrolsüz kullanımı sonucu, hastalık etmeni funguslarda dayanıklılık oluşturabilme riskleri ve kalıntılar yoluyla insan sağlığına ve çevreye olumsuz etkileri önemlidir. Toprak kökenli bu patojen ile mücadelede en etkili ve çevreci yol dayanıklı çeşit kullanmaktır. Dayanıklı çeşit kullanımı sadece verim ve kalitenin artışı değil, aynı zamanda kimyasal kullanımını da azaltmaktadır. Günümüzde birçok yeni çeşit geliştirilmiş olmasına rağmen, hastalık ve zararlılara dayanıklılığın iyileştirilmesi konusunda çalışmaların devam etmesi gerekmektedir.

Fusarium solgunluğu kavun yetiştiriciliği yapılan ülkelerde ciddi kayıplara sebep olmaktadır. Patojen, Türkiye dahil dünyanın birçok yerinde önemli kayıplar meydana getirmektedir. Türkiye'deki kavun üretim alanlarının %85 oranında hastalık görüldüğü ve hastalık oranının %17 ile %95 arasında değiştiği belirtilmektedir [6]. Ayrıca meyve kalitesinin düşmesine bağlı olarak pazarlanabilir verimin düşmesi de bir başka kayıp olarak değerlendirilmektedir. Yapılan bu çalışma elde edilen kavun genotiplerinin *F.oxysporum* f.sp. *melonis*'e dayanıklılık durumları, moleküler olarak belirlenmiştir.

MATERYAL VE METOT

Çalışmamızda TÜBİTAK-TEYDEB imkânlarıyla yürütülen 3190164 numaralı projenin kapsamında elde edilen 5 baba hat ve 39 ana hattın melezlenmesi ile elde edilen 195 birey izolasyonu gerçekleştirilmiş ve bunların FOM-1 ve FOM-2'ye dayanım durumları moleküler yöntemler ile irdelenmiştir.

Çalışmada kullanılan hatlarda her hattan 10 adet olacak şekilde tohum ekimi gerçekleştirilmiştir. Moleküler karakterizasyon için genç fide döneminde bulunan her genotipi temsil edecek şekilde on adet bitkiden steril bistöri yardımıyla bitkinin sağlıklı, genç yapraklarından (yaklaşık 0.25 g) DNA izolasyonu için örnekler alınmıştır. Bitkilerden alınan genç yaprak örnekleri sıvı azot (-196°C) ile dondurularak 80°C derin dondurucuda DNA izolasyonu yapıncaya kadar muhafaza edilmiştir.

Kavun yaprak doku örneklerinden toplam DNA izolasyonu DNeasy Plant Mini Kit (250) (Qiagen) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kavun DNA örneklerinin PCR analizlerinde SCAR ve CAPS markör setleri kullanılmıştır (Çizelge 1). PCR reaksiyonları Frary ve Fulton [7] tarafından önerilen yönteme göre yapılmıştır. Bu yönteme göre: 25 µl reaksiyon karışımı içerisinde 1 µl kalıp DNA (40-60 ng/µl), 2.5 µl 10× PCR tampon çözeltisi (1×), 0.5 µl dNTP (0.2 mM), her birinden 0.5 µl olmak üzere ileri (Forward) ve geri (Reverse) primerler (10 pmol), 0.25 µl Taq polimerase enzimi (0.25U) ve 19.75 µl steril dH₂O içermektedir. PCR reaksiyonları GeneAmp®PCR System 9700 (Applied Biosystems) cihazı kullanılarak yapılmıştır. PCR profili (35 döngü için 94°C/5 dakika, 94°C/30 saniye, 50°C/45 saniye, 72°C/45 saniye 72°C/5 dakika ve 4°C tutulur) kullanılarak uygulanmıştır. PCR ürünleri %1'lik agarose jel kullanılarak amplifikasyonun olup olmadığı kontrol edilerek polimorfizm sağlayan (gerekli ise) uygun bir restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Bu işlem için 15 µl PCR ürünü, 1.5 µl 10× kesimleme tampon çözeltisi (1×), 0.2 µl (100×) BSA (1×) (enzim için gerekliyse), 0.5 µl restriksiyon enzimi ve 2.8 µl steril dH₂O kullanılmıştır. Reaksiyonda kullanılan enzim tipine bağlı olarak uygun sıcaklıklarda en az 3-4 saat inkübe edilmiştir. Örneklerin kesimlenen parçacıklarının ayrıştırılması için kapiller elektroforez sistemi kullanılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Sonuç olarak FOM-1'de; 184 adet homozigot dayanım (RR), 5 adet homozigot duyarlı (rr), FOM-2 de 129 adet homozigot dayanım (RR), 60 adet homozigot duyarlı (rr) olarak bulunmuştur. Altı adet hatta ise primerler çalışmamıştır.

Çizelge 1. FOM-1 ve FOM-2 dayanıklılık genin seçilim markörleri
Table 1. Selection markers of FOM-1 and FOM-2 resistance gene

Markör İsimleri	Markörler	Primerler	Kesim Enzimi
NBS1-CAPS	CAPS	5'-TATTGCTAAAGCTGTTTTCAAAAAGCG-3'	Alw261
		5'-AACAAAAAAGCTTTTCGATTTCCTAAGTT-3'	
SB17645	SCAR	5'-AGGGAACGAGTTGAGAGAGCTAGA-3'	
		5'-CGAGGATTCTTAACTAGCATGGA-3'	
SV01574	SCAR	5'-TGACGCATGGAATGAAATAAA-3'	
		5'-GCATGGCCAAGGTCTGAATA-3'	
CAPS2	CAPS	5'-CAATTTTGGTTTCTTTGGATGG-3'	TaqI
		5'-TTTCGAGGTTAGAGGTTTGTCA-3'	

Çizelge 2. Hatların hastalık dayanımlarını gösteren çizelge
Table 2. Chart showing disease resistance of genotypes

No	FOM-1	FOM-2	No	FOM-1	FOM-2	No	FOM-1	FOM-2
8*1	RR	rr	19*12	RR	RR	55*22	RR	RR
8*2	RR	rr	19*13	RR	RR	55*23	RR	RR
8*3	RR	rr	19*14	RR	RR	55*24	rr	RR
8*4	RR	rr	19*15	RR	RR	55*25	RR	RR
8*5	RR	rr	19*16	RR	RR	55*26	RR	RR
8*6	RR	rr	19*17	RR	RR	55*27	RR	RR
8*7	RR	rr	19*18	RR	RR	55*28	RR	RR
8*8	RR	rr	19*19	RR	RR	55*29	RR	RR
8*9	RR	rr	19*20	RR	RR	55*30	RR	RR
8*10	RR	rr	19*21	RR	RR	55*31	RR	RR
8*11	RR	rr	19*22	RR	RR	55*33	RR	RR
8*12	RR	rr	32*1	RR	RR	55*34	RR	RR
8*13	RR	rr	32*2	RR	RR	55*35	RR	RR
8*14	RR	rr	32*3	RR	RR	55*36	RR	RR
8*15	RR	rr	32*4	RR	RR	55*37	RR	RR
8*16	RR	rr	32*5	RR	RR	55*38	RR	RR
8*17	RR	rr	32*6	RR	RR	65*1	RR	RR
8*18	RR	rr	32*7	RR	RR	65*2	RR	RR
8*19	RR	rr	32*8	RR	RR	65*3	RR	RR
8*20	RR	rr	32*9	RR	RR	65*4	RR	RR
8*21	RR	rr	32*10	RR	RR	65*5	RR	RR
8*22	RR	rr	32*11	RR	RR	65*6	RR	RR
8*23	RR	rr	32*12	RR	RR	65*7	RR	RR
8*24	RR	rr	32*13	rr	RR	65*8	RR	RR
8*25	RR	rr	32*14	RR	RR	65*9	RR	RR
8*26	RR	rr	32*15	RR	RR	65*10	RR	RR
8*27	RR	rr	32*16	RR	RR	65*11	RR	RR
8*28	RR	rr	32*17	RR	RR	65*12	RR	RR
8*29	RR	rr	32*18	RR	RR	65*13	RR	RR
8*30	RR	rr	32*19	RR	RR	65*14	RR	RR
8*31	RR	rr	32*20	RR	rr	65*15	RR	RR
8*32	RR	rr	32*21	rr	RR	65*16	RR	RR
8*33	RR	rr	32*22	RR	RR	65*17	RR	RR
8*34	RR	rr	32*23	RR	RR	65*18	RR	RR
8*35	RR	rr	32*24	RR	RR	65*19	RR	RR
8*36	RR	rr	32*25	RR	RR	65*20	RR	RR
8*37	RR	rr	32*26	RR	RR	65*21	RR	RR
8*38	RR	rr	32*27	RR	RR	65*22	RR	RR
8*39	RR	rr	32*28	RR	RR	65*23	RR	RR
8*40	RR	rr	32*29	RR	RR	65*24	RR	RR
8*41	RR	rr	32*30	RR	RR	65*25	RR	RR
8*42	RR	rr	32*31	RR	RR	65*26	RR	RR
8*43	RR	rr	32*32	rr	RR	65*27	RR	RR
8*44	RR	rr	32*33	RR	RR	65*28	RR	RR
8*45	RR	rr	32*34	RR	RR	65*29	RR	RR
8*46	RR	rr	55*1	RR	RR	65*30	RR	RR
8*47	RR	rr	55*2	RR	RR	65*31	RR	RR
8*48	RR	rr	55*3	RR	RR	65*32	RR	RR
8*49	RR	RR	55*5	RR	RR	65*33	RR	RR
8*50	RR	rr	55*6	RR	RR	65*34	RR	RR
8*51	RR	rr	55*7	RR	RR	65*35	RR	RR
8*52	RR	rr	55*8	RR	RR	65*36	RR	RR
8*53	RR	rr	55*9	RR	RR	65*37	RR	RR
8*54	RR	RR	55*10	RR	RR	65*38	RR	RR
19*1	RR	rr	55*11	RR	RR	65*39	RR	RR
19*2	RR	rr	55*12	RR	RR	65*40	RR	RR
19*3	RR	rr	55*13	RR	RR	65*41	RR	RR
19*4	RR	RR	55*14	RR	RR	65*42	RR	RR
19*5	RR	rr	55*15	RR	RR	65*43	RR	RR
19*6	rr	rr	55*16	RR	RR			
19*7	RR	RR	55*17	RR	RR			
19*8	RR	rr	55*18	RR	RR			
19*9	RR	rr	55*19	RR	RR			
19*10	RR	RR	55*20	RR	RR			
19*11	RR	RR	55*21	RR	RR			

Açıklama: RR: Dayanıklı; rr: hassas

Bu tespitler ışığında kullanılan markör SV01⁵⁷⁴ FOM-1 lokusunda, 574 bp'de ve markör SV17⁶⁴⁵ 645 bp'de dayanıklı genotip bant vermektedir. Markör SV06¹⁰⁹² primeri (1092-bp) uzunluğundaki bant ise hassas bant meydana getirmektedir [8]. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlarda SV17⁶⁴⁵ ve SV06¹⁰⁹² bu markörler genotipler ile uyum içinde çalışmıştır. Risser ve Banihashemi [5] yaptıkları çalışmada *F.oxysporum* f.sp. *melonis*'in ırklarını 4 gruba ayırarak ırk 0, ırk 1, ırk 2 ve ırk 1-2 olarak sınıflandırmıştır. FOM-1 geni ırk 0 ve ırk 2 ye dayanıklılık sağlarken FOM-2 geninin ırk 0 ve ırk 1'e dayanıklılık sağladığı belirtilmiştir. Demirelli [9], Kırkağaç meyve tipindeki sekiz adet kavun genotipinde yürüttüğü çalışmada NBS1-CAPS primerinde 7 genotipte homozigot dayanımı (RR) ve bir genotipte heterozigot dayanımı bulmuştur. FOM-1-R/FOM-1-S primerinde ise dört genotip çalışmamış ve üç genotipte heterozigot dayanım tespit etmiştir. Kahraman ve İlbi [10] yürüttükleri çalışma ile 44 yerel kavun çeşidi için SCAR ve CAPS moleküler markörlerini kullanılarak FOM-1 ve FOM-2 genlerine dayanıklılığı araştırmışlardır. FOM-0 ve FOM-1 ırkları için dayanıklı genleri tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda dayanıklı genotipler ıslah çalışmalarında *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*'e dayanıklı yeni yerli çeşitlerin elde edilmesinde kullanılabilecektir.

SONUÇ

Çalışma sonucunda kavunda olmazsa olmaz FOM'a dayanım düzeyi incelenmiştir. F₁ çeşitlerinde heterozigot dayanım yeterli olacağı gerekliliği göz önüne alınarak FOM'a dayanıklı olan çeşit adayları belirlenmiştir. Bu çeşit adaylarının agro-morfolojik özellikleri de göz önüne alınarak bazı çeşit adaylarının tescile konu olabileceği ortaya konulmuştur ve lokasyon denemeleri sürmektir. Dayanıklılık genlerini taşıyan genotipler ıslahçılar açısından önemli genetik kaynaklardır. Çalışma sonucunda dayanıklı genotipler ıslah çalışmalarında *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*'e dayanıklı yeni yerli çeşitlerin elde edilmesinde kullanılabilecektir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK-TEYDEB imkânlarıyla yürütülen 3190164 numaralı projenin bir bölümüdür. Desteklerinden dolayı TÜBİTAK-TEYDEB'e teşekkürlerimi sunarım.

KAYNAKLAR

1. Baran, B., 2000. Güneydoğu Anadolu Bölgesi kavun ekim alanlarında solgunluk hastalığı etmeni (*Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*) (Leach and Currence)'nin yaygınlığı ve bu etmene karşı bazı kavun çeşitlerinin tepkileri (Yüksek Lisans Tezi). Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, Van.
2. Oumouloud, A., Otmani M. El., Alvarez J., 2015. Molecular characterization of Fom-1 gene and development of functional markers for molecular breeding of resistance to *Fusarium* race-2 in melon. *Euphytica*, 205:491-501.
3. Schmidt, S.M., J. Lukaszewicz, R. Farrer, P.V. Dam, C. Bertoldo, M. Rep, 2016. Comparative genomics of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* reveals the secreted protein recognized by the Fom-2 resistance gene in melon. *Europe PMC Funders Group*, 209:307-318.
4. Blancard, D., H. Lecoq, M. Pitrat, 1994. A colour atlas of cucurbit diseases: observation, identification and control. ISBN:978-1-874-54515-6.
5. Risser, G., Z. Banihashimi, D. Davis, 1976. A proposed nomenclature of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* races and resistance genes in *Cucumis melo*. *Phytopathology*, 66:1105-1106.
6. Şensoy, S., 2005. Türkiye kavunlarındaki genetik varyasyonun ve *Fusarium* solgunluğuna dayanıklılığın fenotipik ve moleküler yöntemlerle araştırılması (Doktora Tezi). Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Bölümü, Van.
7. Frary, A., T.M. Fulton, D. Zamir, S.D. Tanksley, 2004. Advanced backcross QTL analysis of a *Lycopersicon esculentum* XL. *pennellii* cross and identification of possible orthologs in the Solanaceae. *Theor Appl. Genet.* 108:485-496.
8. Oumouloud, A., M.S. Arnedo-Andres, R. Gonzalez-Torres, J.M. Alvarez, 2008. Development of molecular markers linked to the Fom-1 locus for resistance to *Fusarium* race 2 in melon. *Euphytica*, 164:347-356.
9. Demirelli, M.B., 2020. Farklı tipteki kavun genotiplerinin *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*'e dayanıklılık durumlarının klasik ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi (Yüksek Lisans). Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, Antalya, 36s.
10. Kahraman, A., H. İlbi, 2012. Determination of resistant local varieties to *Fusarium* wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*) with molecular markers. *Cucurbitaceae 2012: Proceedings of the 10. Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae*, Adana.