

BAZI KARPUZ GENOTİPLERİNİN SSR ve SRAP MARKÖRLERİ İLE KARAKTERİZASYONU¹

Characterization of Some Watermelon Genotypes by SSR and SRAP Markers

İlknur SOLMAZ

Bahçe Bitkileri Anabilim
Dalı

Nebahat SARI

Bahçe Bitkileri Anabilim
Dalı

Yıldız AKA-KAÇAR

Bahçe Bitkileri Anabilim
Dalı

ÖZET

Bu çalışmada, Çukurova Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümü karpuz genetik kaynak koleksiyonunda yer alan toplam 93 genotip arasındaki genetik çeşitlilik SSR ve SRAP markörleri ile değerlendirilmiştir. Araştırmada, 14 SSRprimeri ve 31 SRAP primer kombinasyonu kullanılmıştır. En yüksek polimorfizm oranı, % 100 ile SSR markörlerinden elde edilmiş ve bunu % 97.3 ile SRAP markörleri izlemiştir. Moleküler karakterizasyon sonucu elde edilen verilerle yapılan kümeleme (cluster) analizlerine göre Türkiye'nin değişik bölgelerinden toplanan *Citrullus lanatus* var. *lanatus* alt türüne ait karpuz genotiplerinin genetik olarak birbirine yakın olduğu ve birlikte kümelendiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Citrullus lanatus*, Polimorfizm, Moleküler markörler, Genetik kaynaklar

ABSTRACT

In this study, the genetic diversity of 93 genotypes selected from the watermelon genetic resource collection of Horticulture Department in Çukurova University was evaluated by SSR and SRAP markers. Fourteen SSR primers and 31 SRAP primer combinations were used in the experiment. The highest polymorphism with 100 % was obtained from SSR markers, followed by SRAP markers with 97.3 %. According to cluster analysis performed using molecular characterization data set, it was determined that watermelon genotypes collected from the different regions of Turkey of which belong to *Citrullus lanatus* var. *lanatus* subspecies were genetically close and grouped together in the same cluster.

Key Words: *Citrullus lanatus*, Polymorphism, Molecular markers, Genetic resources

Giriş

Karpuz [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. ve Nakai], *Cucurbitaceae* familyasının ekonomik öneme sahip en önemli türlerinden birisi olup Afrika, Asya ve Akdeniz'in sıcak bölgelerinde yetişen 4 diploid (n=11) tür içerdiği kabul edilmektedir (Robinson ve Decker-Walters, 1997; Wehner, 2008).

*
Doktora Tezi-Ph.D.Thesis

Bitki genetik kaynakları; klasik ıslah yöntemleri için çeşitli özelliklere sahip başlangıç materyalleri sağlamasının yanında, içerdikleri genetik çeşitlilik nedeniyle son yıllarda hızla ilerleme kaydeden biyoteknoloji alanında üstün nitelikli bitki çeşitlerinin geliştirilmesi için gerekli hammadde niteliğindedir.

Karpuzlarda yapılan klasik taksonomi çalışmalarında kullanılan meyve şekli, meyve kabuk rengi, tohum şekli ve tohum rengi gibi morfolojik karakterler bazı genotiplerin ayırımında yeterli olmamakla birlikte (Che ve ark., 2003), birçoğu çevresel koşullar tarafından düzenlenmekte veya etkilenmektedir (Provvidenti, 1994).

Protein ya da DNA'da bulunan polimorfizme dayanan moleküler markörlerin geliştirilmesi; taksonomi, filogeni, ekoloji, genetik ve bitki ıslahı alanlarında yürütülen çalışmaları büyük oranda kolaylaştırmaktadır. Bitki dokusuna ve çevresel faktörlere bağımlı olmamaları ve bitki gelişiminin erken aşamalarında dahi kullanılabilmeleri, moleküler markörlerin çok yararlı araçlar olduğunu göstermektedir (Espósito ve ark., 2007).

Moleküler markörler, germplasm içerisindeki çeşitliliğin araştırılması, genotipler arasındaki genetik yakınlıkların ortaya çıkarılması, çeşitlerin tanımlanması, tohum saflığının belirlenmesi, sistematik çalışmaları, genetik kaynak koleksiyonlarının bazı spesifik genler bakımından taranması ve genom haritalamasında etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Böylece klasik bitki ıslahı sürecinde karşılaşılan sorunların çözümünde bitki ıslahçılarına yeni ufuklar açmaktadırlar (Kumar, 1999; Levi ve ark., 2001).

Bu çalışmanın amacı; Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü karpuz genetik kaynak koleksiyonunda yer alan ve farklı orijinlere sahip olan 93 adetlik bir çekirdek koleksiyondaki genetik çeşitliliğin SSR ve SRAP markör teknikleriyle araştırılmasıdır.

Materyal ve Metot

Materyal

Çalışmada, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'ne ait karpuz genetik kaynak koleksiyonundan seçilen 88 adet genotip ile 5 adet ticari çeşitten oluşan toplam 93 adet genotip kullanılmıştır.

Metot

Tez çalışması kapsamında bazı karpuz genotiplerinin SSR ve SRAP markörleri ile karakterizasyonu gerçekleştirilmiş, ayrıca Fusarium Solgunluğuna dayanımları klasik ve moleküler yöntemlerle araştırılmıştır.

DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için iki üç yapraklı genç fidelerden yaprak örnekleri alınarak alüminyum folyoya sarılmış, sıvı azota daldırılarak -196 °C'de dondurulmuş ve -85 °C'de muhafaza edilmiştir. DNA izolasyonu, Çukurova

Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarında MiniPrep DNA izolasyon yöntemi (Edwards ve ark., 1991) ile gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA'ların miktar ve kaliteleri, 1.5 µl DNA örneği kullanılarak spektrofotometre (Nanodrop ND-100) ile ölçülmüştür.

SSR Analizleri

Mikrosatellit analizlerinde toplam 14 adet SSR primer çifti kullanılmıştır. Tüm PCR reaksiyon bileşenleri DNA amplifikasyonu amacıyla termalcyler (Eppendorf-Master Gradient Model) içerisine yerleştirilmiştir. PCR ürünleri % 6.5'luk poliakrilamid jelde koşturulmuştur. Elektroforez işlemi 1.5 saat süreyle 1500 V, 35 mA, 50 W, ve 48°C çalışma koşullarına sahip Li-Cor aletinde gerçekleştirilmiştir. Bantların değerlendirilmesinde 50-350 bp DNA markörü (MWG Biotech AG, Ebersberg, Germany) kullanılmıştır.

SRAP Analizleri

Çalışmada SRAP Analizleri Li ve Quiros (2001)'a göre yapılmıştır. Dokuz adet forward (ileri) ve 10 adet reverse (geri) primerinin farklı kombinasyonları kullanılmıştır. Tüm PCR reaksiyon bileşenleri DNA amplifikasyonu amacıyla Master Gradient model termal cyler (Eppendorf) içerisine yerleştirilmiştir PCR döngüsü (**Li ve Quiros, 2001**)'a göre yapılmıştır.

Primerlerin Polimorfizm Oranlarının Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan SSR ve SRAP primerlerinin polimorfizm oranları, primerlerden elde edilen toplam polimorfik bant sayısının, toplam bant sayısına bölünerek 100 ile çarpılması sonucu aşağıda belirtilen formül ile bulunmuştur. Polimorfizm Oranı (%) = (Polimorfik bant sayısı / Toplam bant sayısı) x 100

Benzerlik İndeksleri ve Dendrogramların Oluşturulması

SSR ve SRAP markörleri ile yapılan moleküler analizler sonucunda elde edilen jel görüntülerine bakılmış ve bant varlığı durumunda (1), yokluğu durumunda (0) ve amplifikasyonun olmadığı durumlarda (9) değerleri verilerek ikili (binary) matriks veri dosyası hazırlanmıştır.

Dendrogramların oluşturulmasında NTSYS (Numerical Taksonomy and Multivariate Analysis System Version 2.0) paket programı kullanılmıştır (Rohlf, 1998). Öncelikle Jaccard (1908) yöntemi kullanılarak bir benzerlik matriksi oluşturulmuştur. Bu matriks kullanılarak UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average*) metodu ile kümeleme (Cluster) analizleri yapılmış ve dendrogramlar elde edilmiştir.

Araştırma Bulguları ve Tartışma

Karpuz Genotiplerinin SSR Tekniği ile Karakterizasyonunda Polimorfizmin Değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılan 14 adet SSR lokusundan büyüklükleri 102-235 bp arasında olan toplam 66 adet allel elde edilmiş ve bunların tamamı polimorfik bulunmuştur (Çizelge 1). Primer başına düşen toplam allel sayısı 2 ile 7 (ortalama

4.7) arasında değişmiştir. Polimorfik allel sayısı ise yine 2 ile 7 (ortalama 4.7) arasındadır. Elde edilen toplam allel sayısı bakımından Cgb4765 ve Cgb4767 lokusları en fazla (7 adet), CLG7992 ve ASUW2 lokusları ise en az (2 adet) sayıda alleli üretmiştir. Primer çiftlerinden elde edilen toplam polimorfizm oranı ise % 100 bulunmuştur.

Çizelge 1. SSR primerlerinin amplifikasyonu sonucu elde edilen toplam allel sayısı (adet), polimorfik allel sayısı (adet), allel büyüklükleri (bp), polimorfizm oranı (%)

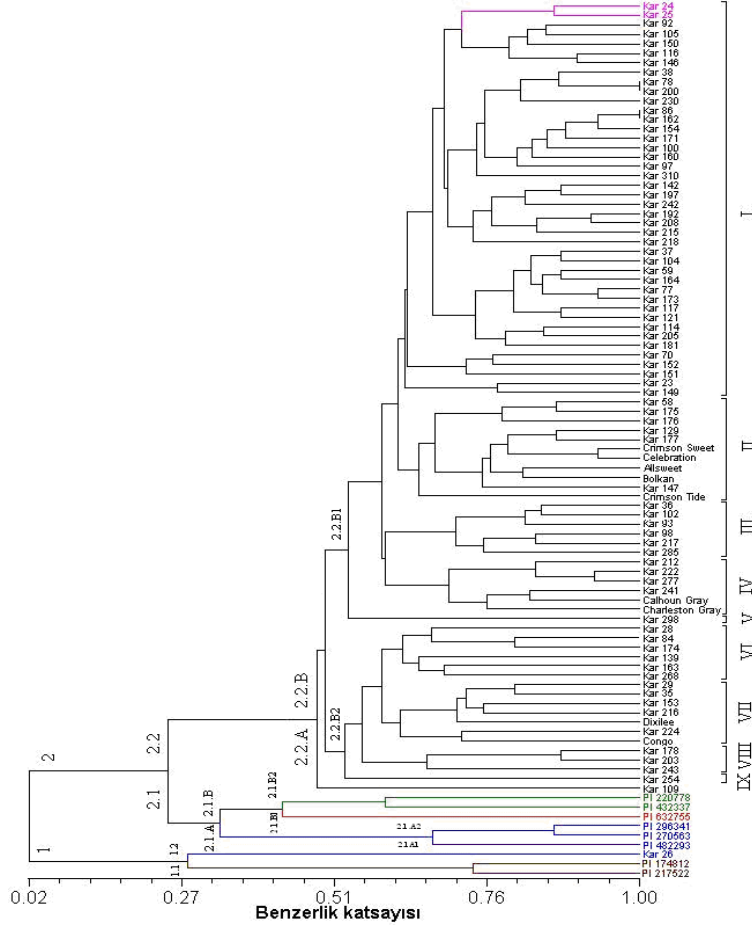
No	Primer Adı	Toplam Allel Sayısı (adet)	Polimorfik Allel Sayısı (adet)	Polimorfizm oranı (%)
1	CMCT44	4	4	100
2	CMACC146	3	3	100
3	CMTC168	5	5	100
4	Cgb4765	7	7	100
5	CLG7992	2	2	100
6	Cgb4767	7	7	100
7	ASUW2	2	2	100
8	ASUW13	4	4	100
9	ASUW19	4	4	100
10	Cgb5009	6	6	100
11	C.1. 1-06	4	4	100
12	C.1. 1-20	6	6	100
13	C.1. 2-23	6	6	100
14	C.1. 2-140	3	3	100
Toplam	-	66	66	-
Ortalama	-	4.7	4.7	100

Tez çalışması kapsamında SSR analizlerinden elde edilen bulgulara bakıldığında 14 adet primerden 2-7 arasında allel elde edildiği görülmektedir. Karpuzlarda ve diğer *Cucurbitaceae* türlerinde SSR markörlerinin kullanıldığı farklı çalışmalarda bu sayı ile uyumlu değerler olduğu gibi, daha az veya daha çok allelin görüldüğü çalışmalar da bulunmaktadır. Karpuzlarda Jarret ve ark. (1997)'nin *C. lanatus* var. *lanatus*, *C. lanatus* var. *citroides* ve *C. colocynthis* türlerine ait 33 genotiple yaptıkları çalışmada 3-7 arasında, Guerra-Sanz (2002), *C. lanatus* genotipleri ve çeşitlerinde 1-8 adet arasında, *C. colocynthis* genotiplerinde 0-2 adet arasında ve hibritlerde 0-4 adet arasında allel tespit etmişlerdir. Nimmakayala ve ark. (2009) ise 30 SSR primer çiftinin 2-12 arasında

allel ürettiğini bildirmişlerdir. Çalışmada tespit edilen % 100 polimorfizm oranı karpuzlarda farklı markörlerle elde edilen polimorfizm oranlarına (RAPD % 5, Levi ve ark., 2007; % 60.2, Solmaz ve ark., 2010; ISSR % 80.2, Levi ve ark., 2004; % 40.0, Levi ve ark., 2007; AFLP % 97.8, % 81; Levi ve ark., 2004; 2007; SRAP % 80.5, Levi ve ark., 2007) göre oldukça yüksek bir değerdir.

SSR Analizleri Sonucu Elde Edilen Dendrogramın Değerlendirilmesi

SSR analizleri sonucu oluşturulan dendrogram (Şekil 1) incelendiğinde, genotipler arasındaki genetik benzerlik oranının 0.02 ile 1.00 arasında değiştiği görülmüştür. Kar 78 ile Kar 200 ve Kar 86 ile Kar 162 hariç, diğer tüm genotiplerin ve çeşitlerin birbirinden ayrıldığı saptanmıştır. Bu çalışmada birbiriyle çok yakın ilişkili genotipleri ayırmada son derece başarılı olan SSR markörlerinin, farklı orijinlere sahip genotiplerin oluşturduğu germplazmda bazı genotipleri birbirinden ayıramadığı saptanmıştır.



Şekil 1. SSR markörleri ile elde edilen dendrogram

Karpuz Genotiplerinin SRAP Tekniği ile Karakterizasyonunda Polimorfizmin Değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılan 31 primer kombinasyonundan elde edilen bant büyüklükleri 100-1000 bp arasında değişmiştir (Çizelge 2). En küçük bant uzunluğu 100 bp ile me1em4, me1em11 me3em1, me3em3, me3em4, me4em2, me4em3, me5em1, me5em4, me7em8 ve me11em1 kombinasyonlarından, en büyük bant uzunluğu ise 1000 bp ile me1em6, me2em6, me3em2, me3em3, me3em6, me4em6, me5em2, me5em6, me5em12 kombinasyonlarından elde edilmiştir. Değerlendirilen 31 primer kombinasyonu, 461'i polimorfik toplam 472 adet bant üretmiştir.

Primer başına elde edilen toplam bant sayısı 10-25 (ortalama 15.2) arasında, toplam polimorfik bant sayısı ise 8-25 (ortalama 14.9) arasında

değişmiştir. En fazla bant me5em12 (25 adet) kombinasyonundan, en az bant ise me5em1 (10 adet) kombinasyonundan elde edilmiştir. Polimorfik bant sayısı bakımından ise me5em12 kombinasyonu en çok (25 adet), me4em1 kombinasyonu ise en az (8 adet) bantı üretmiştir

Primerlerin toplam polimorfizm oranı ise % 97.3 olarak tespit edilmiştir. Polimorfizm oranı en yüksek primer kombinasyonları % 100 ile me1em4, me2em3, me2em4, me2em5, me2em6, me3em1, me3em2, me3em3, me3em4, me3em5, me3em6, me4em2, me4em3, me4em4, me4em6, me5em2, me5em3, me5em5, me5em6, me5em12, me6em6, me9em11, me11em1 iken, en düşük oran ise % 72.7 ile me4em1 primer kombinasyonuna aittir

Kolay uygulanabilen, tekrarlanabilen aynı zamanda ucuz ve etkili bir markör sistemi olan SRAP'ın (Li ve Quiros, 2001) aynı zamanda çok sayıda polimorfik bant verebilen bir markör sistemi olduğu Guo ve Luo (2006) tarafından bildirilmiştir.

Araştırmada kullanılan 31 SRAP primer kombinasyonundan elde edilen toplam bant (472) ve toplam polimorfik bant sayısının (461) araştırmacıların tespitiyle uyumlu bulunduğu görülmektedir.

Karpuzlarda SRAP markör tekniği kullanılarak yapılan genetik çeşitlilik çalışmalarında elde edilen primer başına ortalama bant sayısının ve polimorfizm oranının yürütülen tez çalışması ile karşılaştırıldığında daha düşük değerler aldığı dikkati çekmektedir. Örneğin Levi ve Thomas (2007), genetik çeşitlilik seviyesi oldukça düşük olan 24 karpuz genotipinde polimorfizmi, toplam 146 markör (RAPD, ISSR, AFLP, SRAP) kullanarak araştırmış ve 53 RAPD marköründen 5'inin (% 9.4), 15 ISSR marköründen 6'sının (% 40.0), 37 AFLP marköründen 30'unun (% 81.0) ve 41 SRAP marköründen 33'ünün (% 80.5) polimorfik olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, SRAP markörlerinin AFLP markörleri kadar etkili olduğunu ve karpuz genomunda farklı bağlantı (linkage) bölgelerini temsil ettiğini bildirmişlerdir.

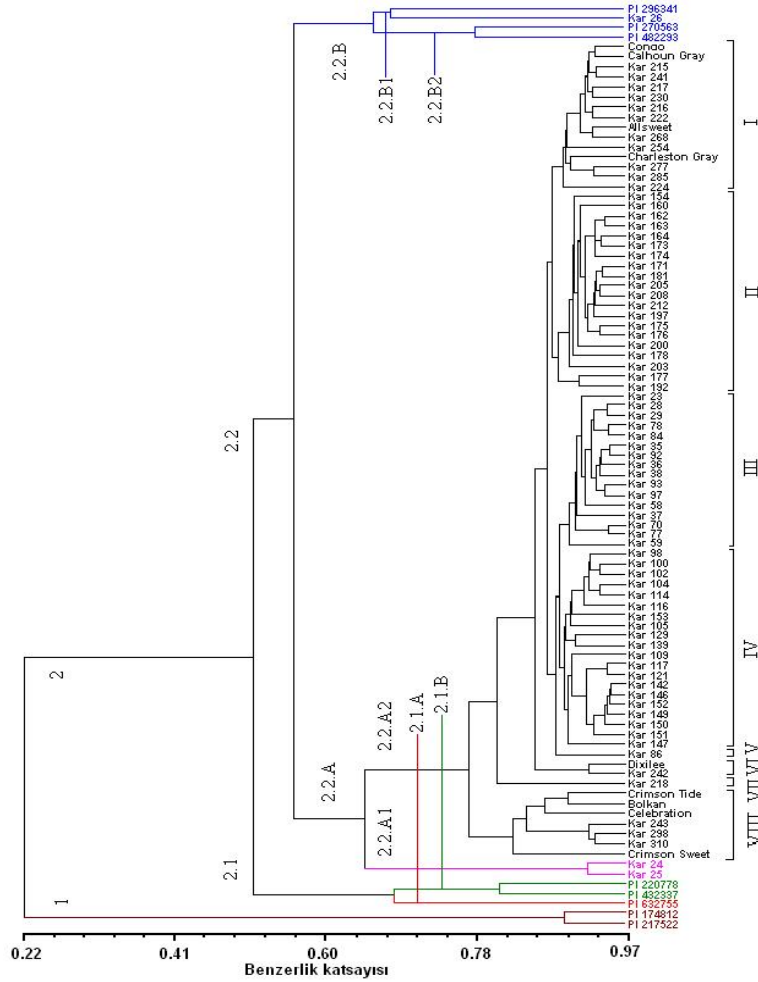
Çizelge 2. SRAP primerlerinin amplifikasyonu sonucu elde edilen toplam bant sayısı (adet), polimorfik bant sayısı (adet), bant uzunluk aralıkları (bp), polimorfizm oranı (%)

Primer Çifti	Toplam Bant Sayısı (adet)	Polimorfik Bant Sayısı (adet)	Bant Uzunluk Aralıkları (bp)	Polimorfizm Oranı (%)
me1em3	12	11	175-900	91.7
me1em4	15	15	100-950	100
me1em6	11	10	175-1000	90.9
me1em11	18	18	100-900	100
me2em3	14	14	150-900	100

me2em4	16	16	150-900	100
me2em5	11	11	150-900	100
me2em6	16	16	150-1000	100
me3em1	11	11	100-750	100
me3em2	17	17	125-1000	100
me3em3	15	15	100-1000	100
me3em4	15	15	100-950	100
me3em5	15	15	125-900	100
me3em6	17	17	125-1000	100
me4em1	11	8	125-900	72.7
me4em2	17	17	100-950	100
me4em3	14	14	100-900	100
me4em4	14	14	150-900	100
me4em6	16	16	175-1000	100
me5em1	10	9	100-900	90
me5em2	16	16	150-1000	100
me5em3	13	13	175-900	100
me5em4	23	22	100-925	95.7
me5em5	12	12	175-925	100
me5em6	15	15	150-1000	100
me5em10	16	15	150-900	93.8
me5em12	25	25	125-1000	100
me6em6	18	18	125-900	100
me7em8	15	13	100-900	86.7
me9em11	18	18	125-800	100
me13em4	16	15	125-925	93.8
Toplam	472	461	-	-
Ortalama	15.2	14.9	-	97.3

SRAP Analizleri Sonucu Elde Edilen Dendrogramın Değerlendirmesi

Dendrogram (Şekil 2) incelendiğinde genotiplerin tamamının birbirinden ayrıldığı, 93 adet genotipin genetik benzerlik düzeyinin 0.22 ile 0.97 arasında değiştiği ve temelde 2 ana grup oluştuğu (1 ve 2) görülmüştür. Birinci ana grupta (1) yer alan *Praecitrullus fistulosus* genotipleri (PI 217522 ve PI 174812) 0.22 benzerlik düzeyinde *Citrullus* cinsine giren tüm genotipleri içeren ikinci ana gruptan (2) ayrılmıştır. Karpuzlarda genetik çeşitliliğin RAPD markörleriyle araştırıldığı Solmaz ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiş, *Praecitrullus fistulosus* genotipleri diğer tüm *Citrullus* genotiplerinden 0.26 benzerlik düzeyinde ayrılmış ve genetik olarak da birbirlerine % 98 oranında yakın bulunmuştur.



Şekil 2. SRAP markörleri ile elde edilen dendrogram

Sonuç

Bu çalışma ile Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan karpuzlarda genetik çeşitlilik ilk kez moleküler olarak SSR ve SRAP markör teknikleri ile araştırılmıştır. Sonuç olarak her ne kadar morfolojik özellikler açısından çok farklı olsalar da kültürü yapılan *Citrullus lanatus* var. *lanatus* alt türünde yer alan bu genotiplerin genetik olarak yüksek düzeyde polimorfizme sahip olmadıkları saptanmıştır. Bu durumun Türkiye'nin karpuzun gen merkezinden uzak olmasından ve yabancı formların ülkemizde yetişmemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Elde edilen veriler, karpuzlarda genetik çeşitlilik konusunda yapılacak çalışmalara önemli bir kaynak olup, yol gösterecektir. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda karpuzlarda meyve kalitesini ve hastalıklarını kontrol eden genlerin

haritalanması ve bu genlerle bağlantılı markörlerin geliştirilerek ıslahta kullanımı üzerinde durulmalıdır.

Kaynaklar

- CHE, K., LIANG, C., WANG, Y., JIN, D., WANG, B., 2003. Genetic Assesment of Watermelon Germplasm Using the AFLP Technique. Hortscience, 38 (1): 81-84.
- EDWARDS, K., JHONSTONE, C., THOMPSON, C., 1991. A Simple and Rapid Method for The Preparation of Plant Genomic DNA for PCR Analysis. Nuc. Acid. Res., 19(6): 1349.
- ESPÓSITO, M. A., MARTIN, E.A., CRAVERO, V.P., COINTRY, E., 2007. Characterization of Pea Accessions by SRAP's Markers. Sci. Hort., 113(4): 329-335.
- GUO, D.L., LUO, Z.R., 2006. Genetic Relationships of Some PCNA Persimmons (*Diospyros kaki* Thunb.) from China and Japan Revealed by SRAP Analysis. Genetic. Resour. Crop. Evol., 53: 1603-1797.
- JACCARD, P., 1908. Nouvelles Reserches sur la Distribution Florale. Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat., 44: 223-270.
- 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.
- KUMAR, L.S., 1999. DNA Markers in Plant Improvement: An Overview. Biotechnology Advances, 17: 143-182.
- LEVI, A., THOMAS, C.E., KEINATH, A.P., WEHNER, T.C., 2001. Genetic Diversity Among Watermelon (*Citrullus lanatus* and *Citrullus colocynthis*) Accessions. Genet. Resour. Crop. Evol., 48: 559-566.
- LEVI, A., THOMAS, C.E., NEWMAN, M., REDDY, O.U.K., ZHANG, X., XU, Y., 2004. ISSR and AFLP Markers Sufficiently Differentiated Among American Watermelon Cultivars with Limited Genetic Diversity. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 129: 553-558.
- LEVI, A., WECHTER, W.P., DAVIS, A., KATZIR, N., TADMOR, Y.K., LING, K.S., REDDY, U.O.U., 2007. Interspecific Transferability of Watermelon EST-SSR Markers in Cucurbit Species. Hortscience, 42 (4): 1012.
- LI, G., QUIROS, C.F., 2001. Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP), A New Marker System Based on a Simple PCR: Its Application to Mapping and Gene Tagging in *Brassica*. Theor. Appl. Genet., 103: 455-461.
- 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.
- PROVVIDENTI, R., 1994. Inheritance of a Partial Chlorophyll Deficiency in Watermelon Activated by Low Temperature at the Seedling Stage. HortScience, 29: 1062-1063.

- ROBINSON, R.W., DECKER-WALTERS, D.S., 1997. Cucurbits. CAB International, New York, NY, USA
- ROHLF., 1998. NTSYS-PC Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.00. Exeter Software, Setauket, New York.
- SOLMAZ, I., SARI, N., AKA-KACAR, Y., YALCIN-MENDI, Y., 2010. The Genetic Characaterization of Turkish Watermelon (*Citrullus lanatus*) Accessions Using RAPD Markers. Genet. Resour. and Crop Evol, DOI: 10.1007/s10722-009-9515-2, Published Online: 29 Jan. 2010.
- WEHNER, T.C., 2008. Watermelon In: Prohens J. and Nuez F. (eds.) Handbook of Plant Breeding; Vegetables I: Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, and Cucurbitaceae. Springer Science+Business LLC, New York, NY, 381-418.