



## Genetic diversity analysis with the development of new SSR markers in *Cucurbita pepo* L. population

Şerife Eylül Duman<sup>1,a,\*</sup>, Ali Tefvik Uncu<sup>2,b</sup>, Ahmet Kayraldiz<sup>3,c</sup>

<sup>1</sup>Department of Dental Services, Meram Vocational School, Necmettin Erbakan University 42090 Konya, Turkey

<sup>2</sup>Department of Molecular Biology and Genetics Faculty of Science, Necmettin Erbakan University 42090 Konya, Turkey

<sup>3</sup>Department of Biology Faculty of Arts and Sciences, Kahramanmaraş Sütçü İmam University, 46050 Kahramanmaraş, Turkey

\*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 26/11/2019 Accepted : 04/08/2020</p> <p><b>Keywords:</b> <i>Cucurbita pepo</i> L. SSR Simple Sequence Repetitions Genetic Diversity Capillary electrophoresis</p>	<p>Cucurbitaceae family, contain lots of important species in terms of worldwide nutritional and economical value. Despite the molecular genetic researches conducted in recent years, genome data is quite limited for <i>C. pepo</i> which is agriculturally important. The main motivation of this work is to develop new and numerous SSR markers (Simple Sequence Repetitions) that is unique to <i>Cucurbita</i> genome which has extremely small number of genome-specific markers. The reference genome was scanned with bioinformatic tools in terms of repetitive motifs and 76744 genome-specific SSR loci were found. In this scope, 52303 SSR markers were developed for the first time by containing 20 chromosomes in <i>C. pepo</i> L. genotype and the data that belongs to the developed markers is saved in a database. The majority of the most common SSR motifs were detected as di-nucleotide repeats which was rich in terms of AT/AT. To evaluate the amplification efficiency and polymorphic band producing capability of newly developed SSR markers, a collection which contains 39 <i>Cucurbita pepo</i> L. genotypes is characterized and the SSR alleles are scored as 0/1, so that the data file was subjected to the analysis of genetic diversity in DARwin6 software program. The results of this study were evaluated as obtaining important molecular genetic markers of the pumpkin and using them in the future studies of molecular breeding and mapping to obtain important information.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 8(12): 2518-2527, 2020

## Çerezlik Kabak (*Cucurbita pepo* L.) popülasyonlarında yeni SSR markörlerinin geliştirilmesi ile genetik çeşitlilik analizi

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 26/11/2019 Kabul : 04/08/2020</p> <p><b>Anahtar Kelimeler:</b> <i>C. pepo</i> L. SSR markörleri Basit Dizi Tekrarları Genetik çeşitlilik Kapiler elektroforez</p>	<p>Cucurbitaceae familyası, dünya çapında ekonomik değer ve besin değeri açısından önemli birçok türü içerir. Son yıllarda yapılan moleküler genetik araştırmalara rağmen tarımsal öneme sahip kabak <i>Cucurbita pepo</i> L. türü ile ilgili genom bilgisi oldukça sınırlıdır. Bu çalışmanın esas amacı, genom spesifik markör sayısı son derece az olan kabak genomuna özgün yeni ve çok sayıda SSR markörlerinin (Basit Dizi Tekrarları) geliştirilmesidir. Kabak referans genomu tekrar motifleri açısından biyoinformatik araçlar ile taranmış ve kabak genomuna spesifik toplam 76744 adet aday SSR lokusu bulunmuştur. Çalışma kapsamında ilk kez çerezlik kabak kromozomlarını kapsayacak şekilde toplam 52303 adet SSR markörü geliştirilmiş ve üretilen markörlere ait bilgiler veri tabanlarına yüklenmiştir. Bu çalışmada, en fazla rastlanan SSR motiflerinin çoğunluğu AT/AT bakımından zengin olan di-nükleotid tekrarları olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen yeni SSR markörlerin amplifikasyon durumu ve polimorfik bant üretme gücünü test etmek amacı ile 39 adet çerezlik kabak (<i>Cucurbita pepo</i> L.) genotipinden oluşan bir koleksiyon karakterize edilmiş ve SSR alelleri, var/yok (1/0) şeklinde skorlanmış olup veri dosyası DARwin6 programında genetik çeşitlilik analizlerine tabi tutulmuştur. Çalışma sonuçları ile, kabak genomuna önemli moleküler genetik markörler kazandırılarak ileride yapılacak moleküler ıslah ve haritalama çalışmaları için önemli bilgiler kazandırılabilceği düşünülmektedir.</p>

<sup>a</sup> [seduman@erbakan.edu.tr](mailto:seduman@erbakan.edu.tr)

<sup>b</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0336-817X>

<sup>c</sup> [atuncu@erbakan.edu.tr](mailto:atuncu@erbakan.edu.tr)

<sup>d</sup> <https://orcid.org/0000-0003-4729-5750>

<sup>e</sup> [akayraldiz@ksu.edu.tr](mailto:akayraldiz@ksu.edu.tr)

<sup>f</sup> <https://orcid.org/0000-0002-5174-2165>



## Giriş

Cucurbita cinsi ( $2n=2\times=40$ ) en eski yetiştirilen bitki türlerinden bazılarını içerir (Smith, 1997; Piperno ve Stothert, 2003). Kuzey Amerika'da yerli, güney Amerika'da ve kuzeydoğu Meksika'da yabancı olarak büyüdüğü görülmüştür (Bailey, 1943; Andres, 1987). En fazla kültürü yapılan türler arasında Cucurbita cinsi içinde bulunan yazlık kabaklar (*Cucurbita pepo L.*), kışlık kestane kabakları (*Cucurbita maxima Duch.*) ve bal kabakları (*Cucurbita moschata Pour.*)'dır (Paris, 2001). Bugün, bunlardan üçü, *C. pepo L.*, *C. moschata Duch.* ve *C. maxima Duch.*, dünya çapında ekonomik açıdan önemli bitki türleridir (Robinson ve Decker Walters, 1997).

Çerezlik kabaklar, genelde *Cucurbita pepo L.* türüne girmektedir. *Cucurbita pepo L.* türüne ait yazlık kabaklar 3 alt sınıfa ayrılmaktadır. *Cucurbita pepo L. ssp. pepo* yemeklik, çerezlik ve süs bitkisi olarak kullanılan kabaklar krem, sarı yuvarlak veya uzun meyveli, düz veya siğilli kabuk yüzeyine sahip; ikinci olarak *Cucurbita pepo L. ssp. ovifera*, yağlık ve yemeklik olarak kullanılan kabaklar oval ve armut şeklinde meyvelere sahip; son olarak *Cucurbita pepo L. ssp. fraternaise*, kuzeydoğu Meksika'da yetişen yabancı tipteki kabakları temsil etmektedir (Ferriol, 2000). Cucurbita tohumları, bulundurduğu besin miktarları bakımından Mg, Mn ve P açısından zengin; Fe, Cu, protein, tekli doymamış yağ ve çinko açısından ise iyi bir tohumdur. Çerezlik kabak, uzun süredir sadece yiyecek için değil, aynı zamanda önemli tıbbi özellikleri olmasından dolayı yetiştirilmiştir (Lazos, 1986; Isutsa ve Mallowa, 2013). Kabak çekirdeği içerisinde bulunan bol miktarda lif sayesinde kan şekerinin daha dengeli yükselmesini sağladığı, kabızlık, osteoporoz hastalığının tedavisinde ve bazı kanser türlerinin önlenmesinde etkili olduğu belirlenmiştir (Ermiş, 2010).

Türkiye, çok sayıda sebze türünün üretilmesine imkan veren ekolojik koşullara sahiptir. Ülkemizde önceki yıllarda belirlenen istatistiklerde çerezlik kabak ürünü için üretim miktarına rastlanmazken, 2004 yılından sonra üretim miktarları hesaplanmaya başlanmıştır. Çerezlik kabak üretimimizin 2004 yılından itibaren 10.500 ton civarında olduğu belirtilmektedir (Sunulu ve Yağcıoğlu, 2014). 2014 yılı verilerine bakıldığında çerezlik kabak üretim miktarımız toplam 469.306 dekar alanda 31.604 ton olmuştur. Son istatistiklere dayanan FAO verilerine göre, dünya kabak üretiminde; ilk sıralarda Çin, Hindistan ve Rusya ülkeleri yer alırken, Türkiye bu sıralamayı üretim miktarını arttırarak 580.624 ton ile 9. sırada yer alarak takip etmektedir (FAO, 2017).

Ülkemizde son zamanlarda çerezlik kabaklarının üretiminin artmasının nedenleri arasında, diğer kabak türlerinin yetiştiriciliğinden daha karlı olması nedeniyle ekonomik avantajlar sağlamakta, kıraç koşullarda dahi yetiştiriciliğinin yapılabilmesi, 28 yemeklik kabak türüne kıyasla daha az su, gübre, ilaç tüketiminin olması, ekim, gübreleme, çapalama ve çekirdek ayrımının makine ile yapılabilmesiyle nedeniyle işçilik masraflarının daha az olması, depolama ömrünün uzun olması ve pazarlama konusundaki ürünler arasında en sorunsuz olması olarak sıralanabilir (Yanmaz ve Düzeltir, 2003). Son zamanlarda en önemli sorunlardan biri ise, çerezlik kabak üretiminde karşılaşılan çeşit sorunudur. Bu nedenle bölgelere göre uygun, çekirdek verimi ve kalite yönünden yüksek çeşitlerin

geliştirilerek üreten kişilere verilmesi gerekmektedir (Yanmaz ve Düzeltir, 2003; Düzeltir, 2004).

Günümüzde kullanılmakta olan biyoteknolojik uygulamalar sayesinde bitki ıslahında gelişmeler sağlanmıştır. Genetik ilişkilerin değerlendirilmesine yönelik yapılan çeşitlilik çalışmalarında farklı DNA markör veya markörleri başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Bu markörlerden biri olan SSR markörler, ilk olarak (Litt ve Luty, 1989) tarafından insanlarda bulunduktan sonra hızlı bir şekilde diğer canlı organizmalarda da kullanılmaya başlanmıştır. SSR markörleri, DNA dizilerinde tekrar edilen kısa (1-6 bp) ve ardışık tekrarlanan dizilerden oluşur. Bu markörlerde gözlenen polimorfizmler, DNA replikasyonunda polimeraz iplik kaymasının veya rekombinasyon hatalarının neden olduğu motif tekrarlarının sayısındaki farklılıkların bir sonucudur (Vieira ve ark., 2016). SSR markörler, az DNA gerektirmesi, kodominant (eşbaskın) ve kararlı markör sistemi olması, genomda bol ve dağınık bulunması, tekrarlanabilir ve otomasyona uygun olması, yüksek polimorfizm barındırması gibi bilgilendirici bir markör sistemi olduğundan dolayı popülasyon genetiği ve gen haritalama çalışmalarında etkin olarak kullanılabilir (Powell ve ark., 1996).

Kabak (*Cucurbita spp.*) türlerinin tarımsal ve biyolojik önemi olmasına rağmen, yapılan moleküler çalışmaların çoğu şimdiye kadar çok sınırlı kalmıştır. Daha önce literatürlerde, Gonzalez ve ark. (2012) tarafından, kabak BAC klonları kullanılmış ve 7198 adet mikrosatellit tanımlanmıştır. Moleküler anlamda yapılan ilk çalışma ise, Brown ve Myers (2002) tarafından Cucurbita genomunda 28 adet bağlantı grubunda 148 adet RAPD (Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA) markörlerinin kullanılmasıyla haritalama çalışmaları başlamış olup, daha sonrasında çalışmalar AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizm) ve SSR markörler geliştirilerek devam etmiştir (Zraidi ve Lelley, 2004) Son zamanlarda, birçok moleküler çalışma ile, kabakta 1.935 adet (Blanca ve ark., 2011), hıyarda 101.155 adet (Liu ve ark., 2015), biberde 78.389 adet SSR markörü (Uncu A.T, 2018) başarılı bir şekilde tanımlanarak haritalama çalışmalarına ve markör destekli ıslaha önemli katkılar sağlayacağı belirtilmiştir.

Kabak genomunun DNA verisi dizilenerek, 263 Mb gibi büyük bir kısmını kapsayacak şekilde oluşturulan bir referans genomu geliştirilmiştir (Blanca ve ark., 2011). Yapılan bu çalışmayla yeterli referans bilgisine ulaşılmaya başlanmıştır. Son zamanlarda (Montero Pau ve ark., 2018) tarafından, NCBI veri tabanında (NCBI, 2019) Illumina HiSeq yeni nesil sekanslama cihazı ile yapılmış olan çalışmada 263 Mb büyüklüğünde, 34.240 gen modeline sahip *Cucurbita pepo L.* türüne ait ilk genom dizisi NCBI veri bankasında yayınlanmıştır (NCBI accession number: PRJNA386743). Günümüzde, çevrimiçi olarak bilimsel çalışmalarda kullanılabilen Cucurbit Genomics Database (CGD, 2019) ve CucurbiGene (CUCURBIGENE, 2019) iki genom kaynağı daha mevcuttur.

Bu çalışmanın amacı, genomu spesifik markör sayısı son derece az olan kabak genomuna özgün yeni ve çok sayıda SSR markörünün geliştirilmesidir. Geliştirilen yeni SSR markörlerin amplifikasyon durumu ve polimorfik bant üretme gücünü test etmek amacıyla 39 adet çerezlik kabak

(*Cucurbita pepo* L.) genotipinden oluşan bir koleksiyon karakterize edilmiştir. Geliştirilen markörlerin amplifikasyon verimliliği doğrulanarak test edilmiş olup, moleküler genetik çeşitliliği tayin etmek için kullanılmıştır. Bu çalışma, moleküler bitki ıslahında çerezlik kabakta üreme sürecini hızlandırırken aynı zamanda yüksek kalitede üstün çeşitler elde etmek için ileride yapılacak genomik çalışmalar için de yol gösterici niteliktedir.

## Materyal ve Yöntem

Bu çalışmada, çerezlik kabak türüne ait yapraklar, Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri bölümünden temin edilmiştir. Türkiye'nin Doğu Ege ve İç Anadolu bölgelerinden elde edilmiş belirli koleksiyona ait 39 adet çerezlik kabak (*C.pepo*) genotiplerine ait yerel çeşitler (18 adet), ıslah materyali (20 adet) olarak kullanılan RIL (Rekombinant Saf Hat) popülasyonuna sahip çeşitler ve yabancı çeşit (1 adet) olmak üzere üç popülasyondan yapraklar kullanılmıştır. Serada ekimi yapılmış çerezlik kabak yapraklarından örnekler alınarak laboratuvara getirilmiş ve DNA izolasyonu yapılmaya kadar -80°C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Aşağıda çalışmada kullanılan çerezlik kabak genotipleri Çizelge 1'de sırası ile verilmiştir.

### DNA İzolasyonu

Çerezlik kabak genotiplerinden alınan taze yaprak örnekleri sıvı azot ile homojenize haline getirilerek 2 ml'lik eppendorf tüpler içerisine konulmuştur. DNA ekstraksiyonu ile, NucleoSpin® Plant II (Midi Macherey-Nagel Duren, Germany) kiti kullanılarak her bir genotipten yeterli ve eşit miktarda DNA elde edilmiştir. İzole edilen DNA'dan 1,5 µl DNA örneği ile spektrofotometre (NanoDrop ND 1000, Thermo Co.) cihazı kullanılarak 260/280 nm dalga boyunda ölçümler yapılmıştır. Çerezlik kabak genotiplerine ait DNA örnekleri, agaroz jelde 5 µl EtBr (Etidyum Bromid) / 100 ml saf su içinde 20 dakika süreyle karıştırıcı üzerinde boyanmış ve agaroz jelle

yüklenmiştir. Boyama işleminin ardından jeller görüntüleme sistemi ile Ultraviyole (UV) ışık altında görüntülenmiştir.

### SSR Markör Analizi ve Primer Tasarımı

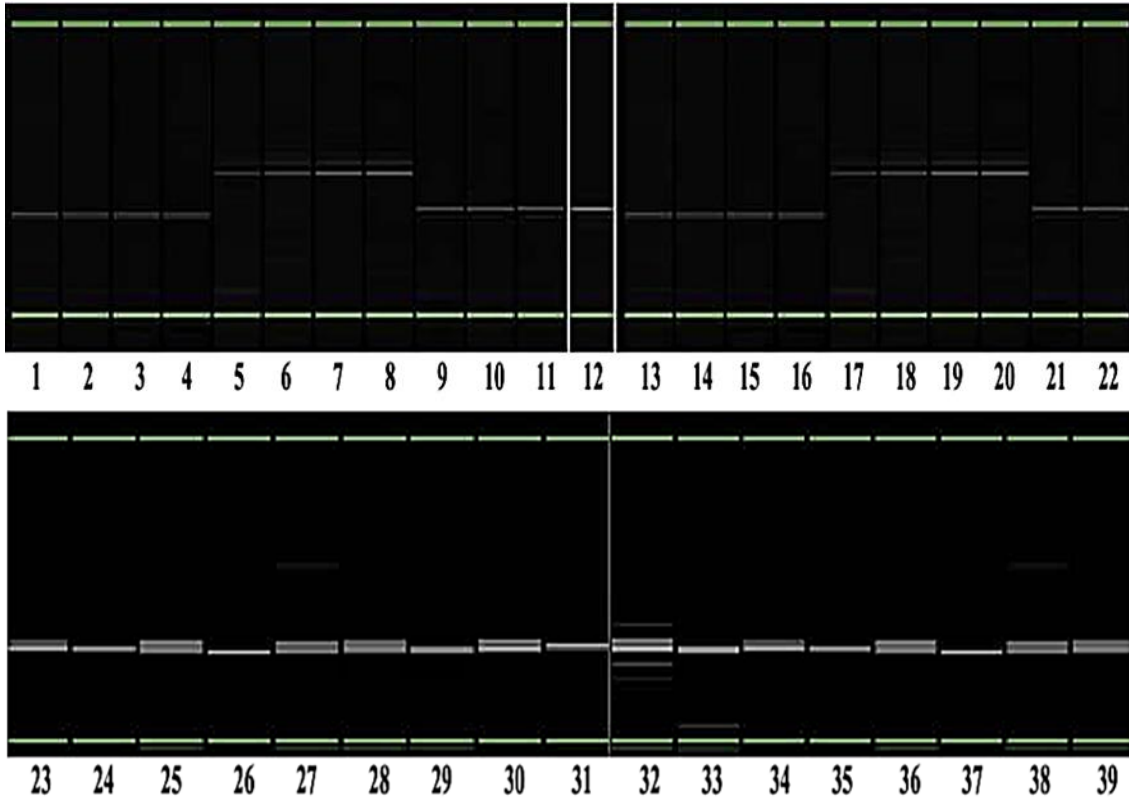
SSR markörlerinin geliştirilmesi için NCBI veri tabanından 20 kromozoma dağılmış şekilde 263 Mb genom büyüklüğündeki kabak referans genomu kullanılmıştır (Montero Pau ve ark., 2018). Kabak genomuna ait kromozomlarda bulunan DNA dizilerine ait veriler tek tek FASTA formatında indirilerek SSR markörler belirlenmiştir. SSR markörlerine ait tekrarlanan motifler, çerezlik kabak genomu içinde dinükleotid (DNR)  $\geq 6$ , trinükleotid heksanükleotit'e (TNR, TTNR, PNR ve HNR)  $\geq 5$  ve iki SSR arasında 500 bp arasındaki mesafe olacak şekilde parametreleri uygulanarak Perl script programı MISA (Mikrosatellit Tanımlama Programı) ile in silico olarak analizler yapılmıştır.

SSR lokuslarını amplifiye etmek ve güvenilir primerlerin tasarımı için, ileri ve geri primer çiftleri için sıcaklığı (Tm), PCR ürününün büyüklüğü, GC içeriği ve primerlerin boyutu gibi parametreler dikkate alınarak Primer3 v. 0.4.0 programı (Rozen ve Skaletsky 1997) ile primerler tasarlanmıştır. SSR sekanslarına uygun primerler tasarlamak için, her bir dizi için, bulunan tekrarların bir listesi oluşturulmuştur. Giriş dosyası birleştirilmiş okumalar içerebileceğinden, üst üste çakışan tekrarlar atılmıştır. Üretilen tekrarlar listesine ve kullanıcı tarafından seçilen giriş parametrelerine göre Primer3 dosyaları oluşturulup işlenmiştir. Primer3 v. 0.4.0 programında Sequence\_Template bölümü kullanılarak her bir geliştirilen SSR markörü için başlangıç ve bitiş yerleri belirlenmiştir. Her bir SSR için, primer çiftleri kullanılarak primer tasarlanmıştır. Bu çalışmada, kullanılan primerler, %20'den yüksek bir GC içeriği ve optimum 60°C'lik bir sıcaklık (Tm) (primerlere göre 60°C olan sıcaklık dereceleri değişiklik gösterebilmektedir) ile dizayn edilmiştir. Primerlerin baz dizilimleri farklı olması dolayısıyla kalıp DNA'ya bağlanma sıcaklıkları da farklı olmuştur.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan çerezlik kabak genotipleri, çeşitleri ve lokasyonları

Table 1. *Cucurbita pepo* L. genotypes, species and locations used in this work

Genotip No	Çeşit	Genotip No	Çeşit
1.GENOTİP	Yerel Çeşit (Doğu Ege ve İç Anadolu)	21.GENOTİP	Islah Materyali (RIL)
2.GENOTİP	Yerel Çeşit (Doğu Ege ve İç Anadolu)	22.GENOTİP	Islah Materyali (RIL)
3.GENOTİP	Yerel Çeşit (Doğu Ege ve İç Anadolu)	23.GENOTİP	Islah Materyali (RIL)
4.GENOTİP	Yerel Çeşit (Doğu Ege ve İç Anadolu)	24.GENOTİP	Islah Materyali (RIL)
5.GENOTİP	Yerel Çeşit (Doğu Ege ve İç Anadolu)	25.GENOTİP	Islah Materyali (RIL)
6.GENOTİP	Yerel Çeşit (Doğu Ege ve İç Anadolu)	26.GENOTİP	Islah Materyali (RIL)
7.GENOTİP	Yerel Çeşit (Doğu Ege ve İç Anadolu)	27.GENOTİP	Islah Materyali (RIL)
8.GENOTİP	Yerel Çeşit (Doğu Ege ve İç Anadolu)	28.GENOTİP	Islah Materyali (RIL)
9.GENOTİP	Islah Materyali (RIL)	29.GENOTİP	Islah Materyali (RIL)
10.GENOTİP	Yerel Çeşit (Doğu Ege ve İç Anadolu)	30.GENOTİP	Islah Materyali (RIL)
11.GENOTİP	Yerel Çeşit (Doğu Ege ve İç Anadolu)	31.GENOTİP	Islah Materyali (RIL)
12.GENOTİP	Yerel Çeşit (Doğu Ege ve İç Anadolu)	32.GENOTİP	Islah Materyali (RIL)
13.GENOTİP	Yerel Çeşit (Doğu Ege ve İç Anadolu)	33.GENOTİP	Islah Materyali (RIL)
14.GENOTİP	Islah Materyali (RIL)	34.GENOTİP	Islah Materyali (RIL)
15.GENOTİP	Yerel Çeşit (Doğu Ege ve İç Anadolu)	35.GENOTİP	Islah Materyali (RIL)
16.GENOTİP	Yabancı Çeşit	36.GENOTİP	Islah Materyali (RIL)
17.GENOTİP	Yerel Çeşit (Doğu Ege ve İç Anadolu)	37.GENOTİP	Islah Materyali (RIL)
18.GENOTİP	Yerel Çeşit (Doğu Ege ve İç Anadolu)	38.GENOTİP	Yerel Çeşit (Doğu Ege ve İç Anadolu)
19.GENOTİP	Yerel Çeşit (Doğu Ege ve İç Anadolu)	39.GENOTİP	Yerel Çeşit (Doğu Ege ve İç Anadolu)
20.GENOTİP	Islah Materyali (RIL)		



Şekil 1. Geliştirilen MK 6119 markörüne ait polimorfik aleli gösteren kapiler elektroforezi görüntüsü  
 Figure 1. The image of Capillary Electrophoresis (CE) which shows the polimorphic allele of the developed MK 6119  
**PCR Analizleri**

DNA izolasyonu yapılan kabak genotiplerine ait DNA örneklerinden SSR markörlerinin çoğaltılması için yapılan PCR reaksiyonları için; PCR reaksiyonu içeriği toplamda 20 µL hacimli bir örnek, 1 µl DNA (20ng/µl), 1µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM) , 0,5 µl dNTPs (25 mM), 0,75 µl Primer F, 0,75 µl Primer R, 2 µl 10× PCR tamponu, 7,40 µl H<sub>2</sub>O, 1 µl Taq polimeraz olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR cihazında PCR ürünleri ilk olarak DNA denatürasyonu için, 95°C’de 10 dakika; 95°C’de 30 saniye (35 döngü), 60 °C’de 30 saniye (primerlere göre bu sıcaklık dereceleri değişiklik gösterebilmektedir) primer sıcaklıkları ve uzama için 72°C’de 30 saniye, son aşamada ise uzama 72°C’de 10 dakika olarak ayarlanmıştır. Daha sonrasında, PCR ürünleri kullanılacağı zamana kadar -20°C’de bekletilmiştir.

Bu çalışmada, PCR amplifikasyonu sonrasında kabak genotiplerine ait DNA örneklerinden SSR markörleri için geliştirilen primerlerin çalıştığını tespit etmek için kapiler elektroforez sistemi (Qiagen Sample ve Assay Technologies) (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılmıştır. Kılcal elektroforez analizleri için bir Qiaxcel DNA Yüksek Çözünürlüklü Kit (Qiagen) kullanılmıştır. PCR ürünleri, direkt olarak kapiler elektroforez sistemine yüklenerek, SSR markörlerinin bulunduğu genotiplerdeki alel büyüklüklerinin okunması için QIAxcel ScreenGel software programı kullanılmıştır. Yüksek çözünürlükte aleller tespit edilmiş olup, polimorfik bantlar açısından değerlendirilme yapılmıştır. Kapiler elektroforez sisteminde, SSR markörlerinin ortalama uzunlukları 100 ile 350 baz arasında değişmiştir. Bu çalışmada, 50-500 bp analiz eden uzunluk standardı ve 15-600 baz arasında hizalama yapan hizalama markörü kullanılmıştır.

Bu çalışmada, Kapiler elektroforez işlemi sonucunda, yüksek çözünürlükte görüntüleme sağlanarak elde edilen görüntüler, çalışmada kullanılan primerlerin göstermiş olduğu polimorfik bantlar açısından değerlendirilmiştir (Şekil 1). Elde edilen veriler Microsoft Office Excel dosyasında kayıt edilerek yapılacak olan diğer in silico analizler için hazır hale getirilmiştir.

#### Moleküler Genetik Çeşitlilik Analizi

Çerezlik kabak genotipleri arasında genetik benzerlik analizi yapmak için, SSR markörünün her aleli, belirli bir büyüklüğün varlığını ve yokluğunu temsil etmek üzere ‘var (present) = 1’ ve ‘yok (absent) = 0’ şeklinde skorlaması yapılmıştır. Her bir genotipin polimorfik bant örnekleri, çoğaltılan PCR ampliconlarına dayandırılarak skorlandırılmıştır. PIC (Polimorfizm Bilgi İçeriği) değerleri çalışmada kullanılan her bir primer kombinasyonu için ayrıca hesaplanmıştır (Anderson ve ark., 1993). Hesapların yapıldığı formül aşağıdadır.

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

(n: belirli bir markör için alel sayısı; pij: alel frekansı)

SSR markörlerinin skorlanması sonucu elde edilen veriler ile DARwin 6 paket programı kullanılarak benzerlik matrisi üzerinden kabak genotipleri arasındaki genetik uzaklık değerleri elde edilmiştir. Dendrogram oluşturmak için Neighbor Joining (NJ) metodu (Komşu Birleştirme Metodu) kullanılmıştır (Saitou ve Nei 1987). Ayrıca bu çalışmada, Darwin 6 programı kullanılarak kabak genotipleri arasındaki genetik uzaklık değerlerine dayanan temel bileşen analizleri (PCoA) yapılmıştır.

## Bulgular ve Tartışma

Günümüzde yeni nesil teknolojilerinin kullanılması sonucu geliştirilen markörler ile diğer kabak türlerine ait çekirdek koleksiyonlarının genişletilmesi hızlı ve mümkün olmuştur. Gerçekleştirilen çalışma kapsamında farklı popülasyonlara sahip 39 adet *Cucurbita pepo* L. genotipleri kullanılarak, SSR geliştirme analizleri yapılmıştır. Kabak referans genomunun tamamını kapsayacak şekilde çok yüksek yoğunluk ve sayıda SSR markörü geliştirilmiştir. Bu çalışmada, yeni SSR markörlerinin geliştirilmesi için NCBI veri bankasından 20 kromozoma dağılmış şekilde 263 Mb genom büyüklüğündeki kabak referans genomundan kromozomlar tek tek indirilmiştir (Montero Pau ve ark., 2018; NCBI accession number: PRJNA386743). Çalışma kapsamında, kabak referans genomu tekrar motifleri açısından MISA software (Microsatellite identification tool) ile (dinükleotid (DNR)  $\geq 6$ , trinükleotidten heksanükleotit'e (TNR, TTNR, PNR ve HNR)  $\geq 5$ ) taranmış olup, kabak genomuna spesifik 76744 adet SSR lokusu bulunmuştur. Çalışma kapsamında hesaplanan her bir kromozoma düşen SSR markör yoğunluğu, ortalama olarak 3,16 olarak hesaplanmıştır. Genelde, dikotil bitki genomlarında SSR yoğunluğu 1 ila 6 kb da bir SSR markörü arasında değişmektedir (Cardle ve ark., 2000). Bu çalışmada, çerezlik kabak genomunda en sık markör yoğunluğuna 6. kromozom sahip iken; 3,6 kb'da bir adet SSR markörü, en az markör yoğunluğuna sahip 8. kromozomda 2,8 kb'da bir SSR markörü bulunmuştur. Benzer çalışmalarda, kabak genomunda ortalama SSR yoğunluğu 0,65 kb (Gong ve ark., 2008), domates genomunda 3,1 kb (Cavagnaro ve ark., 2010), ıspanak genomunda (Göl ve ark., 2017) bulunmuştur. Yüksek veri çıkışlı markör geliştirme işlemi sonucunda, fazla miktarda bulunan markör motifinden metodolojide verilen kriterler uyarınca Primer3 v. 0.4.0 programı ile 60323 adet primer geliştirilebilecek SSR markörü bulunmuştur. Bu markörlerden, çerezlik kabak genotipinde popülasyondaki her bir bireyi ayıracak şekilde rastgele seçilen 33 adet primer kullanılmıştır (Çizelge 2). Sonuç olarak, SSR lokuslarından 52303 adet çerezlik kabak genomuna özel yeni SSR motifi bulunmuştur. Çalışma sonunda geliştirilen SSR markörlerinde tekrarlayan motifler belirlenmiş ve sınıflandırılmıştır (Çizelge 3).

SSR markör motifleri olan di-heksa nükleotid tipleri için SSR markörleri geliştirilip bu motiflere uygun primerler tasarlanmıştır. SSR markör bölgelerinin kromozom üzerindeki yerleri, tekrar motif tipleri ve primer tasarlamada kullanılan SSR markörlerine ait veriler mevcuttur. Primer tasarımının verimliliğini arttırmak ve yüksek oranda başarılı PCR amplifikasyonu sağlamak için primerler sadece contiglerde tanımlanan SSR'lar için tasarlanmıştır. Bu çalışma kapsamında kabak genomunda ilk kez bilimsel literatürde bilinen SSR markörlerinin 10 katı oranında fiziksel yerleri belli olan çok sayıda SSR markörleri geliştirilmiştir.

Çalışma kapsamında en fazla rastlanan SSR motiflerinin çoğunluğu AT/AT bakımından zengin olan di-nükleotid tekrarları olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen SSR markörleri arasında di-nükleotid tekrarları, tüm SSR markörlerinin %66'sını temsil etmektedir (Şekil 2). Özellikle *C.pepo*'da, AT/AT ve TA/TA motifleri toplamda %45 oranında baskın motifler olarak bulunmuştur. Ayrıca,

tri-nükleotid tekrar motifinin AAT/ATT, tetra-nükleotid tekrar motifinin AAAT/ATTT olduğu belirlenmiştir. Kalan tekrar motiflerinin yüzdesi ise tri-nükleotid (% 25), tetra-nükleotid (%7), penta-nükleotid (%1) ve heksa-nükleotid (%1) arasında değişmekte olup en düşük miktarda tekrar motif tipi heksa nükleotid tipi olmuştur (Şekil 2).

Çizelge 2. Çalışmada kullanılan markörlerin listesi

Table 2. The list of markers used in this work

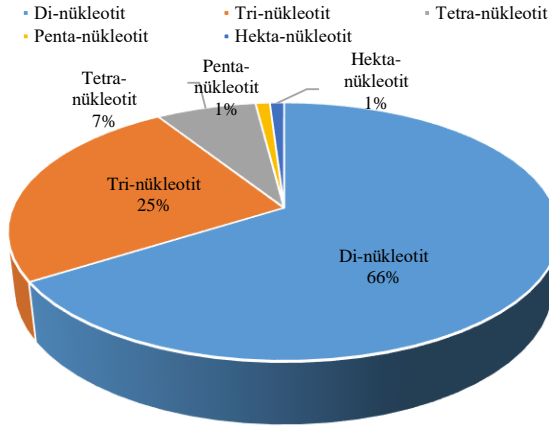
MK14	MK39930	MK21599
MK15	MK39931	MK21600
MK6119	MK39932	MK28614
MK6120	MK39933	MK28615
MK6121	MK46781	MK32060
MK17713	MK46945	MK44111
MK17714	MK12331	MK44111
MK17715	MK12331	MK44112
MK17716	MK12330	MK46779
MK21598	MK14297	MK46780
MK32061	MK14298	MK46944

Çizelge 3. *C.pepo* genomunda geliştirilen SSR motiflerinin sayısı ve oranı

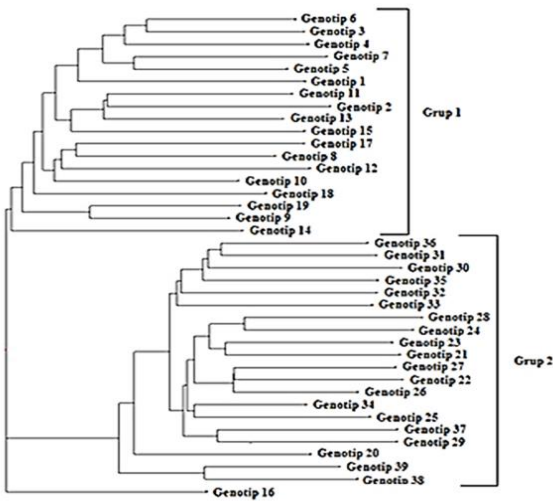
Table 3. The number and the rate of SSR motifs developed in *C. pepo* genome

Mikrosatellit Motif	Toplam	%
AT/AT	17559	25,44
TA/TA	13897	20,13
TC/GA	8163	11,83
AG/CT	7407	10,73
AAT/ATT	5471	7,93
TAA/TTA	3664	5,31
TAT/ATA	1958	2,84
TG/CA	1787	2,59
TTC/GAA	1579	2,29
AC/GT	1572	2,28
AAAT/ATTT	1162	1,68
TAAA/TTTA	1086	1,57
AGA/TCT	1049	1,52
CTT/AAG	977	1,42
AATA/TATT	794	1,15
TTAT/ATAA	745	1,08
GGA/TCC	334	0,48

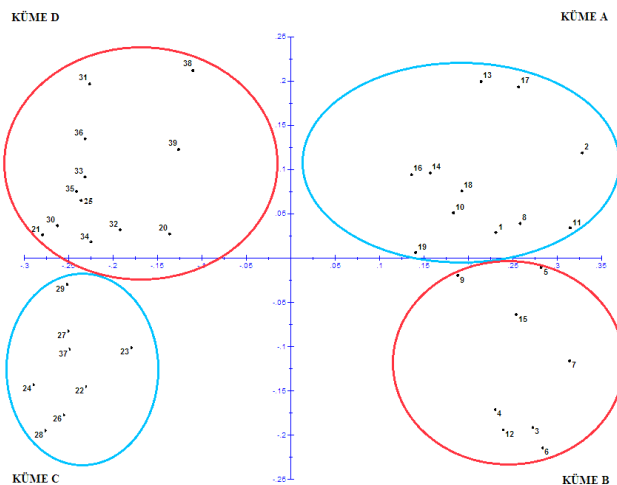
PCR temelli markör genotipleme çalışmalarında mononükleotid tekrarları, nükleotid farkının jel veya birçok kapiler sistemde dahi güvenilir ve tekrar edilebilir şekilde görüntülenmesinde sorun oluşturduğu, mutasyon oluşturma olasılığının yüksek olması ayrıca protein kodlamayan bölgelerde sıklığının yüksek oluşundan dolayı protein kodlayan bölgelere karşı seçilime uğraması gibi sebeplerden dolayı daha az güvenilirdir (Gu ve ark., 2010). Bu nedenlerden dolayı yapılan çalışmada daha güvenilir sonuçlar elde etmek için SSR markör motifleri olan di-heksa nükleotidleri için uygun primerler tasarlanmıştır. Bu sonuçlar ile dikotil bitkilerde yapılmış olan ve en sık rastlanan motif tipinin AT olduğu, diğer markör geliştirme çalışmaları ve literatürleri ile benzer olduğu belirlenmiştir (Gong ve ark., 2008; Qu ve Liu 2013; Cavagnaro ve ark., 2010; Cui ve ark. 2017).



Şekil 2. *C.pepo* genomuna ait SSR (Basit dizi tekrarı) türleri  
Figure 2. SSR species/types belonged to *C. Pepo*



Şekil 3. Unweighted Neighbor-Joining metodu ile oluşturulmuş dendrogram  
Figure 3. The dendrogram obtained by the method of Unweighted Neighbor-Joining



Şekil 4. SSR alel verileri kullanılarak oluşturulan PCoA (Temel Bileşen Analizi) grafiği  
Figure 4. PCoA (Principal Coordinate Analysis) graphic obtained by using SSR alleles data

Çalışma kapsamında geliştirilen markörler, laboratuvar şartlarında amplifikasyon verme gücü, doğruluğu, tekrar edilebilirliği ve polimorfik alel üretme olasılıkları test edilmek üzere 39 adet kabak genotipinden oluşan bir popülasyonunda test edilmiştir. Kabak genotiplerine ait DNA örneklerinden çoğaltılmış olan SSR markörlerine ait polimorfik bantlar ve alel sayıları kapiler elektroforez sistemi (Qiagen Sample ve Assay Technologies) ile belirlenmiş ve görüntüleme sağlanmıştır. Kapiler sistem, SSR markörlerinin görüntülenip skorlanmasında kullanılacak optimum özelliklere sahiptir. Kapiler elektroforezinde görülen bant aralıklarına dayanan amplifikasyon verimine göre seçilen 52303 adet SSR markör içinden yeni 33 adet SSR markör kullanılarak, markörlerin polimorfik durumu ve beklenen alel büyüklükleri değerlendirilmiştir. Hem markörlerin durumu hem de genotipler arası genetik ilişkilerin hesaplanması sağlanmıştır. Çalışmada kullanılan SSR markörlerine ait ayrıntılı bilgiler Çizelge 4’de verilmiştir. Kabak çekirdeğine ait genomun 20 kromozomuna dağıtılmış olan SSR markörlerinden toplamda yüksek oranda 251 adet polimorfik alel (%99) üretilmiştir. SSR markörlerinin primer başına düşen ortalama polimorfik bant sayısı ise 3 alel olarak bulunmuştur. Gupta ve ark., (2010) ise, *C. moschata* türünde yaptıkları çalışmada, kapiler elektroforez ile SSR markörlerinin alel boyutu yüksek bir çözünürlükle başarılı bir şekilde belirlemişlerdir. Bu çalışmada, en fazla alel üreten markörler sırasıyla, MK14, MK6119, MK6121, MK12331, MK12330, MK14297, MK14298, MK21600, MK39930, MK44112, MK46780 ve MK46944’dır. Geliştirilen ve alel sayısı yüksek olan bir marköre (MK 6119) ait polimorfik aleli gösteren kapiler elektroferogram aşağıda verilmiştir (Şekil 1).

SSR markörleri kullanılarak yapılan birçok çalışma sonucunda, SSR’ın Cucurbita cinsine ait türlerde polimorfizmi ve çeşitliliği belirlemede başarılı olduğu belirtilmiştir. (Gong ve ark., 2012; Katzir ve ark., 2000, Paris ve ark., 2003). Katzir ve ark. (2000), *Cucurbita* cinsine ait 28 farklı örnek üzerinde yaptıkları çalışmada ISSR ve SSR markörleri kullanarak, kavuna ait 50 adet SSR primerinden yedisi (%14) polimorfik bulunmuştur. Bu yedi primerden dördü hiç alel vermezken, bir primer iki alel ve diğer iki primer ise üç alel vermiştir. Benzer bir çalışmada ise, *C. pepo*, *C. moschata* ve *C. ecuadorensis* kabak türleri kullanılarak, farklı ülkelere ait 12 genotip içinden 8 adet *C.pepo* genotipi ile yapılan çalışmada geliştirilen 251 adet SSR markörünü genetik çeşitlilik için test etmişlerdir. Çalışma sonunda kabak genotiplerinde toplamda, 500 adet yeni SSR markörü geliştirilmiş, bunların 405’i 12 genotipte polimorfizm göstermiş ve 155 adet polimorfik bant elde edilmiştir (Gong ve ark., 2008). Bu çalışmalar ile, kabağa ait gen havuzunun genişletilmesi sağlanmış ve genetik ilişkilerin belirlenmesi sağlanmıştır.

Çalışmada kullanılan SSR markörler Excel dosyasından var/yok (1/0) şeklinde skorlandıktan sonra, veri dosyası DARwin 6 programı ile benzerlik matrisi üzerinden çerezlik kabak genotipleri arasında genetik uzaklık değerleri belirlenmiştir (Perrier ve Jacquemoud Collet, 2006). Ortalama genetik çeşitlilik değeri 0,23 ve 0,26 arasında bulunmuştur. Cucurbita cinsinden örneklerle yapılan benzer çalışmada ise 88 farklı genotipte 315 alel belirlenmiş ve genetik çeşitlilik değeri 0,37 olarak bulunmuştur (Gong ve ark., 2013).

Çizelge 4. Çalışmada kullanılan SSR markör bilgileri

Table 4. The data of SSR markers used in this work

LG No	Marker Adı	Tekrar Sayısı	Alel Sayısı	Motif	PCR Büyüklüğü	PIC Değeri
LG01	>MK14	6	14	CGA	294	0,38
LG01	>MK15	11	7	AT/CT	298	0,45
LG02	>MK6119	16	6	TTTA/TTA	165	0,33
LG02	>MK6120	9	9	TA	281	0,53
LG02	>MK6121	12	8	TTC	287	0,45
LG04	>MK12331	17	8	AT/AG	288	0,62
LG04	>MK12341	7	12	AGG	288	0,51
LG04	>MK12330	14	6	AAT	286	0,58
LG05	>MK14297	6	9	AG	292	0,66
LG05	>MK14298	9	8	AG	204	0,32
LG06	>MK17713	7	11	AAT	278	0,28
LG06	>MK17714	6	7	AG	105	0,43
LG06	>MK17715	23	7	AT	255	0,34
LG06	>MK17716	5	6	TC	204	0,45
LG08	>MK21598	5	11	TC	277	0,38
LG08	>MK21599	5	7	AAAT	275	0,57
LG08	>MK21600	7	11	AT	284	0,38
LG11	>MK28614	11	7	AAT	214	0,66
LG11	>MK28615	7	4	AT	276	0,53
LG13	>MK32060	5	6	TTA	193	0,51
LG13	>MK32061	5	3	AT	295	0,62
LG17	>MK39930	5	8	TA	281	0,28
LG17	>MK39931	7	8	CG	108	0,28
LG17	>MK39932	5	8	TA	288	0,35
LG17	>MK39933	5	5	TA	178	0,56
LG19	>MK44110	5	6	TGTGT	285	0,46
LG19	>MK44111	11	7	TTAA/TAA	285	0,67
LG19	>MK44112	9	8	TA	300	0,34
LG20	>MK46779	8	10	GA	199	0,38
LG20	>MK46780	10	5	AG	211	0,24
LG20	>MK46781	11	6	AAT/ATT	283	0,36
LG20	>MK46944	17	9	AT/TA	207	0,63
LG20	>MK46945	7	4	GA	255	0,57

Analizler sonucunda en düşük genetik uzaklık değeri 0,25 ve en yüksek genetik uzaklık değeri 0,81 olarak belirlenmiştir. Kabak genotipleri arasında en düşük genetik uzaklık değerleri sırasıyla, RIL popülasyonuna ait 0,25 (34 nolu genotip) ile (26 nolu genotip); 0,27 (36 nolu genotip) ile 0,27 (34 nolu genotip) ve (31 nolu genotip) ile 0,27 (27 nolu genotip) ve (26 nolu genotip) arasında aynı değerde bulunmuştur. En yüksek genetik uzaklık değeri olan 0,81 ise ıslah materyali olan RIL popülasyonuna ait (28 nolu genotip) ile Doğu Ege ve İç Anadolu Bölgesine ait yerel çeşit (17 nolu genotip) arasında bulunmuştur. Genotipler arasında coğrafi yakınlık ile genetik uzaklık arasındaki sonuçların çoğunlukla birbirleriyle uyumlu bulunmuştur.

DARwin 6 programı sonucunda, Neighbor Joining (NJ) metodu kullanılarak (Saitou ve Nei, 1987) oluşturulan genetik ilişkiyi gösteren dendrogram incelendiğinde, 39 genotipin, 3 grup oluşturduğu ve bazı gruplarında farklı alt gruplara ayrıldığı görülmüştür. Moleküler genetik ilişkileri gösteren dendrogram, olasılık katsayısı kullanılarak çizilmiştir (Şekil 3). Uzaklık matrisi ile Unweighted Neighbor Joining metodu programı arasındaki korelasyon mantel test ile belirlenmiştir ( $r=0,963$ ). Çalışmada bulunan SSR markörleri, yüksek ayırt edici gücünün bir göstergesi olan 0,28'lik bir ortalama PIC değerine sahiptir (Çizelge 3).

PIC değerleri 0,25'den düşük, düşük polimorfizmi, değerleri 0,25 ve 0,5 ortalama polimorfizmi ve değerleri, 0,5'ten yüksek, yüksek polimorfik lokusu gösterir (Liu ve ark., 2007). Bu çalışmada, SSR markörlerinin PIC değerleri 0,5'in altında olduğundan dolayı düşük oranda bir polimorfizm olduğunu göstermektedir. En yüksek PIC değerine sahip markörün 0,67 değerinde MK44111 markörüne ait olduğu görülmüştür (Çizelge 4). Bu çalışmada SSR markörleriyle elde edilen genetik çeşitlilik değeri, farklı bir çalışmada kullanılan *C. moschata* türü arasında AFLP markörleri tarafından elde edilen gen çeşitliliğinden daha az olmuştur (Wu ve ark., 2011). Bazı çalışmalarda PIC değeri, kullanılan SSR markörlerin sayısına ve genotip sayısına ve analiz şekline göre değişmiştir. SSR markörleriyle yapılan diğer çalışmalarda, kavun için PIC değeri 0,49 ile 0,75 arasında, hıyar için 0,18 ile 0,64 arasında bulunmuştur. Markörlerden PKCT111 markörü en büyük genetik çeşitlilik gösterdiği için bu markör en bilgilendirici olarak kabul edilmiştir (Katzir ve ark., 1996). Kenya'da 96 adet kabak örneği ile SSR markörleri kullanılarak yapılan çalışmada ortalama PIC değeri 0,49 olarak belirlenmiş, küme analizi ile genotiplerin arasındaki benzerlik düzeyinin yüksek olduğunu gösterilmiştir. (J.K. Kiramana ve ark., 2017).

Genetik uzaklık matrisi verileri ile dendrogram beraber değerlendirildiğinde sonuçların sadece birkaç istista dışında uyumlu olduğu görülmektedir. Farklı uzunluklardaki dendrogram dalları çerezlik kabak genotip örneklerinin aralarında genetik olarak bir fark olabileceğini göstermektedir. Neighbor Joining (NJ) metodu ile oluşturulan dendrogramda 2 grup oluşmakta ve bu gruplar da alt gruplara ayrılmaktadır. İç Anadolu'da yerel çeşit olan grup, ikinci grubun çoğunluğu ıslah materyali olan RIL grubu ve üçüncü grupta yabancı çeşit olarak bulunmaktadır. Analizler sonucunda ortaya çıkan dendrogramda birinci grup incelendiğinde, genotiplerin çoğunluğu yerel çeşittir. Yalnız ıslah materyali olan 9 ve 14 no'lu genotipler ıslah materyali olmasına rağmen dendrogramda yerel çeşitlerin içinde Grup 1'de yer alması aralarında genetik yakınlık olabileceğini düşündürmektedir. Dendrogramda Grup 1 içerisinde bulunan, 9 ve 19 no'lu genotiplerin genetik uzaklık olarak yakın ilişkili genotipler oldukları, 14 no'lu genotipin ise bu genotiplerden farklılaşarak ayrı bir dal oluşturduğu bulunmuştur. Aynı şekilde çoğunluğu ıslah materyali bulunduran Grup 2 içerisinde, yerel çeşit olan 38 ve 39 no'lu genotiplerin genetik uzaklık değerlerinin 0,28 bulunduğu için bu çeşitlerin ortak genetik orjinden geldikleri, yakın ilişkili genotipler oldukları yalnız yerel çeşitken zaman içerisinde ıslah materyali olarak kullanıldığı düşünülmektedir. Son olarak, diğer gruplardan ayrı olarak yabancı bir çeşit olan 16 no'lu genotip, diğer gruplara hem genetik uzaklık bakımından ayrı bulunmuş, hem de dendrogramda ayrı bir grup olarak ortaya çıkmıştır. Böylece, genetik çeşitliliğin belli bir dereceye kadar coğrafi bölge ile ilişkili olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada PCoA analizi ile, genel olarak *C.pepo* türlerine ait popülasyonlarda yeni geliştirilen SSR markörleriyle farklı bölgelerden gelen kabak örnekleri arasında coğrafi açıdan bir kümelenme ortaya çıkmaktadır. Ölçülen değişkenler açısından grafikteki farklı genotiplere ait benzerlikler bir koordinat üzerinde gösterilmiştir. PCoA analizi sonucu, örnekler dört küme olacak şekilde (A, B, C ve D) gruplara ayrıldığı görülmüştür (Şekil 4). Yerel grubun bulunduğu Küme A'da genelde yerel çeşitler bulunmakta (11 genotip), Küme B'de ıslah materyali ve yerel çeşitler birlikte bulunmakta (8 genotip), Küme C'de sadece ıslah materyali bulunmakta (8 genotip) ve Küme D'de ise yerel çeşitler ve ıslah materyali birlikte (12 adet) bulunmaktadır. Grafikte ıslah materyali ve yerel çeşitler, yabancı çeşit örneğinden birbirine daha yakın olarak gruplanmıştır. Bu da yerel çeşitlerin zamanla ıslah için RIL popülasyonuna dönüşmüş olabileceğini göstermektedir. Küme A bölgesi, yerel çeşitlerin ve yabancı çeşidin bulunduğu pozitif bölgedir. Yabancı çeşidin yerel genotipler ile birlikte kümelenmesi, yerel çeşite dönüşebileceği hakkında bilgi verirken, genetik çeşitlilik yönünden dar olduğu bilinen kabak gen havuzu için şartırcı değildir (Şekil 4). Kabak genomunun evcilleştirme kökeninin diğerlerinden farklı olduğu ve zamanla yerel çeşit olarak bilinen bu örneklerin geçmişte yurt dışından gelme ihtimali olabileceğini düşünebiliriz. Dendrogramda ayrılan yerel çeşitlere ait genotipler sırasıyla koordinat eksenini üzerindeki Küme A ve B; RIL ıslah materyaline ait örneklerde Küme C ve D bölümünde dağılım göstermiş, elde edilen analiz sonuçları dendrogram ile çoğunlukla uyum sağlamaktadır. Bu sonuçlar, ilerde çalışma yapılan

bitkilerde ıslah çalışmalarında anaç olarak kullanabilecek olan araştırmacılara; genetik olarak birbirine uzak olduğu bulunan kabak genotipleriyle yapılacak markör destekli ıslah çalışmalarında geniş varyasyon oluşturulması açısından önemlidir. Gong ve ark. (2012)'de yaptıkları araştırmada kullanılan Cucurbita cinsine ait 104 genotip, 134 SSR markörü kullanmış dendrogram ve PCoA kümelendirme analizi yapılmıştır. Çalışmanın sonuçları, *C. pepo*, *C. texana* ve *C. fraterna*'yı temsil eden üç küme arasında dağıldığı görülmüştür. *C. texana* türü arasında genetik uzaklık 0,33-0,41 bulunurken, *C. pepo* türü arasındaki genetik uzaklık 0,27-0,37 arasındadır. İki alt tür olan *C. pepo* ve *C. texana* arasında genetik yakınlık bulunmasının sebebi olarak, iki yerel alt türün tanımlanmamış yabancı atalarının kalıntıları olduğu belirtilmektedir.

Martins ve ark. (2015), Portekiz'den toplanmış olan 54 adet *C. pepo*, 32 adet *C. maxima* ve 21 adet *C. moschata* popülasyonu kullanarak genetik çeşitliliği belirlemek için SSR markörü kullanmışlardır. Temel bileşenler analizinde grupların net bir şekilde ayrıldığı ve %100 bir polimorfizm görüldüğü belirtilmiştir. Yapılan çalışmada geliştirilen SSR markörleri kullanılarak, kümeleme analizi sonucunda coğrafi olarak yakın lokasyonlarda olan genotiplerin ayrımında başarılı sonuçlar alındığı, birlikte kümelenen farklı çeşite ait genotiplerin geçmişte kabak çeşitleriyle aynı alanda birlikte yetişmiş olabileceği düşünülmektedir. Bu sonuçlar, ilerde çalışma yapılan bitkilerde ıslah çalışmalarında anaç olarak kullanabilecek olan araştırmacılara; genetik olarak birbirine uzak olduğu bulunan kabak genotipleriyle yapılacak markör destekli ıslah çalışmalarında geniş varyasyon oluşturulması açısından önem arz etmektedir.

Sonuç olarak, dünya çapında önem arz eden bitkilerin markör destekli ıslahının yapılabilmesi için bitki türüne ait genom sekansına dayalı kromozomal lokasyonları bilinen, genomun çoğunlukla tamamını temsil edecek özelliklere sahip moleküler markörlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle, yapılan çalışmayla kabak genotiplerinde geliştirilen SSR markörleri ile bilimsel literatürlere katkı sağlayacak önemli bilgiler elde edilmiştir. İlk kez kabak genomunda kromozom üzerinde fiziksel yerleri belli olan yüksek yoğunlukta yeni SSR markörleri geliştirilmiştir. Kapiler elektroforez sonucunda seçilen yeni markörlerden polimorfik bant ve alel büyüklüklerini belirlenmiş, fazla miktarda alel bulunduran markörler test edilerek yüksek çözünürlükte görüntüleme sağlanmıştır. Geliştirilen SSR markörleri ile, farklı tarımsal ekolojik kökene sahip çerezlik kabak genotipleri arasında genetik çeşitlilik ve genetik ilişkiler başarılı bir şekilde belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan çerezlik kabak genotiplerinin analizler sonucu, yerel ve yabancı kökenli kabak genotiplerinin belirgin bir şekilde ayrıldığı, özellikle aynı ya da yakın coğrafi bölge orijinli genotiplerin dendrogramda çoğunlukla birbirleriyle gruplandığı görülmüştür. Moleküler ıslah yapılırken, yabancı ve farklı türlerle yapılan melezleme çalışmalarıyla geniş bir genetik varyasyon oluşturulması amaçlanıyorsa kabak genotipleriyle melezleme yapılarak birbirine genetik olarak uzak olduğu belirlenen genotipler kullanılabilir. Bunun sonucunda, kabak çeşitlerinin ıslah programlarına eklenmesi sağlanacak ve kabağa ait gen havuzunun genişletilebileceği bilinmektedir. Bu



çalışma, kabak genomuna ait alel çeşitliliği gözönüne alınarak çekirdek koleksiyonlarının oluşturulması, markör destekli ıslah, kabağa ait ekonomik açıdan önemli niceliksel özelliklerin haritalanması konularında yardımcı olacak önemli bilgiler sağlayacaktır.

## Kaynaklar

- Anderson JA, Churchill GA, Autrique JE, Tanksley SD, Sorrells ME. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, 36: 181–186.
- Andres T. 1987. *Cucurbita fraterna*, the closest wild relative and progenitor of *C. pepo*. *Cucurbit Genetics. Cooperative Report*, 10: 69–71.
- Bailey LH. 1943. *Species of Cucurbita*. *Gentes Herb.*, 6: 267–322.
- Blanca J, Canizares J, Roig C, Ziarsolo P, Nuez F, Pico B. 2011. Transcriptome characterization and high throughput SSRs and SNPs discovery in *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *BMC Genomics*, DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-104>
- Brown RN, Myers JR. 2002. A genetic map of squash (*Cucurbita sp.*) with randomly amplified polymorphic DNA markers and morphological markers. *J Am Soc Hort Sci.*, 127: 568–575.
- Cardle L, Ramsay L, Milbourne D, Macaulay M, Marshall D, Waugh R. 2000. Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. *Genetics*, 156: 847–854.
- Cavagnaro, PF, Senalik DA Yang L, Simon PW, Harkins TT, Kodira CD, Huang S, Weng Y. 2010. Genome-wide characterization of simple sequence repeats in cucumber (*Cucumis sativus L.*). *BMC Genomics*, DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-569>
- CGD, 2019. *Cucurbit Genomics Database*. Available from: <http://www.icugi.org/cgi-bin/ICuGI/index.cgi> [Accessed 01 May 2019]
- CUCURBIGENE, 2019. *CucurbiGene*. Available from: <https://cucurbigene.upv.es> [Accessed 01 May 2019]
- Cui J, Cheng J, Nong D, Peng J, Hu Y, He W, Zhou Q, Dhillon NPS, Hu K. 2017. Genome-wide analysis of simple sequence repeats in bitter melon (*Momordica charantia*). *Front Plant Sci*, DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01103>
- DARwin, 2019. Dissimilarity analysis representation for Windows. Available from: <http://darwin.cirad.fr/product.php>. [Accessed 01 April 2019]
- Düzeltir B. 2004. Description of pumpkin lines for seed (*Cucurbita pepo L.*) by morphological characteristics and selection studies. MSc Thesis, Institute of Natural and Applied Sciences, Ankara University, Ankara, Turkey.
- Ermış S. 2010. The effect of ecology on seed production and snack quality of pumpkin (*Cucurbita pepo L.*) in Turkey. PhD Dissertation. Institute of Natural and Applied Sciences, Ankara University, Ankara, Turkey.
- FAO, 2017. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> [Accessed 01 May 2019]
- Ferriol M. 2000. European central Cucurbits database online taxonomy. Available from: [http://www.comav.upv.es/taxonomy\\_intro.html](http://www.comav.upv.es/taxonomy_intro.html) [Accessed 01 May 2019]
- Gong L, Stift G, Kofler R, Pachner M, Lelley T. 2008. Microsatellites for the genus *Cucurbita* and an SSR-based genetic linkage map of *Cucurbita pepo L.* *Theor Appl Genet.*, 117: 37–48.
- Gong L, Paris HS, Nee MH, 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.
- Gong L, Paris H, Stift G, Pachner M, Vollmann J, Lelley T. 2013. Genetic relationships and evolution in *Cucurbita* as viewed with simple sequence repeat polymorphisms: The centrality of *C. okeechobeensis*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60:1531-1546.
- Gonzalez CA, Brasch M, Uhlenheuer DA Gomez CA, Yang L, Brunsveld L, Huskens J, Jonkheijm P. 2012. Supramolecularly Oriented Immobilization of Proteins Using Cucurbit. *Langmuir*, 28: 16364–16371.
- Göl Ş, Göktay M, Allmer J, Doğanlar S, Frary A. 2017. Newly developed SSR markers reveal genetic diversity and geographical clustering in spinach (*Spinacia oleracea*). *Mol Genet Genomics*, 292: 847–855.
- Gu T, Tan S, Gou X, Araki H, Tian D. 2010. Avoidance of long mononucleotide repeats in codon pair usage. *Genetics*, 186: 1077–1084.
- Isutsa DK, Mallova SO. 2013. Increasing leaf harvest intensity enhances edible leaf vegetable yields and decreases mature fruit yields in multi-purpose pumpkin. *J Agric Biol Sci.*, 8: 610–615.
- Katzir N, Danin PY, Tzuri G, Karchi A, Lavi U, Cregan PB. 1996. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 1282–1290.
- Kiramana JK, Isutsa DK, Nyende AB. 2017. Fluorescent SSR markers and capillary electrophoresis reveal significant genetic diversity in naturalized pumpkin accessions in Kenya. *Global J. Biosc. Biotech.*, 6 (1): 34-45.
- Lazos ES. 1986. Nutritional fatty acid and oil characteristics of pumpkin and melon seeds. *Journal of Food Science*, 51 (5): 1382-1383.
- Liu ZP, Liu GS, Yang QC. 2007. A novel statistical method for assessing SSR variation in autotetraploid alfalfa (*Medicago sativa L.*). *Genetics and Molecular Biology*, 30(2): 385-391.
- Liu J, Qu J, Hu K, Zhang L, Li JWB. 2015. Development of genomewide simple sequence repeat fingerprints and highly polymorphic markers in Cucumbers based on next generation sequence data. *Plant Breeding*, 134: 605–611.
- Litt M, Luty JA. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American journal of human genetics*, 44(3): 397.
- Martins S, Carnideb OP, Carvalhob CR, Carnide V. 2015. Assessing genetic diversity in landraces of *Cucurbita* spp. using a morphological and molecular approaches. *Procedia Environmental Sciences*, 29: 68 – 69.
- Montero PJ, Blanca J, Bombarely A, Ziarsolo P, Esteras C, Marti GC, Ferriol M, Gomez P, JAMILENA M, Mueller L, Pico B, Canizares J. 2018. De novo assembly of the Zucchini genome reveals a whole-genome duplication associated with the origin of the *Cucurbita* genus. *Plant Biotechnol. J.*, 16: 1161–1171.
- NCBI, 2019. National center for biotechnology information. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> [Accessed 01 May 2019]
- NUTRITIONDATA, 2008. Pumpkin seed kernels. Nutrition facts. <https://nutritiondata.self.com> [Accessed 01 May 2019]
- Paris H. 2001. History of the cultivar-groups of *Cucurbita pepo*. *Horticultural Reviews*, 25: 71-90.
- Paris HS, Yonah N, Portnoy V, Mozes DN, Tzuri N, Katzir N. 2003. Assessment of genetic relationships in *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) using DNA markers. *Theor. Appl. Genet.*, 106: 971- 978.
- Piperno DR, Stothert K. 2003. Phytolith evidence for early Holocene *Cucurbita* domestication in Southwest Ecuador. *Science*, 299: 1054–1057.
- Perrier X, Jacquemoud-Collet JP. 2006. DARwin software. <http://darwin.cirad.fr/> [Accessed 01 May 2019]
- Powell W, Machray GC, Provan J. 1996. Polymorphism Revealed by Simple Sequence Repeats. *Trends in Plant Science*, 1(7): 215-221.
- Robinson RW, Decker-Walters DS. 1997. *Cucurbits*. CAB International, Wallingford. Oxon, UK; New York, USA ISBN 978-0-85199-133-7.

- Rozen S, Skaletsky HJ. 1997. Primer3 Code. Available from: [http:// www- genome.wi.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.html](http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html) [Accessed 01 May 2019]
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4 (4): 406–425.
- Sunulu S, Yağcıoğlu, M. 2014. Kayseride Çerezlik Kabak (Cucurbita pepo L.) Üreticilerin İşletme, Pazarlama ve Üretim Teknikleri Durumu. Çerezli Kabak Çalıştayı, Kayseri, 26-27 Kasım 2014, s. 13-44.
- Smith BD. 1997. The initial domestication of Cucurbita pepo in the Americas 10,000 years ago. *Science*, 276: 932-934.
- Uncu AT. 2018. Genome-wide identification of simple sequence repeat (SSR) markers in Capsicum chinense Jacq. with high potential for use in pepper introgression breeding. *Biologia*, 74: 119-126.
- Wu J, Chang Z, Wu Q, Zhan H, Xie S. 2011. Molecular diversity of Chinese Cucurbita moschata germplasm collections detected by AFLP markers. *Sci. Hortic.*, 128: 7-13
- Vieira MLC, Santini L, Diniz AL, Munhoz CF. 2016. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39(3): 312-328.
- Yanmaz R, Düzeltir B. 2003. Çekirdek Kabağı Yetiştiriciliği. *Ekin Dergisi*, 26: 22-24.
- Yanmaz R, Düzeltir B. 2004. Kabak çekirdeğinin besin değeri ve sanayide kullanım olanakları. *Popüler Bilim Dergisi*, 11: 19-24.
- Zraidi A, Lelley T. 2004. Genetic map for pumpkin Cucurbita pepo using random amplified polymorphic DNA markers. In *Progress in Cucurbit Genetics and Breeding Research Proceedings of Cucurbitaceae the 8th EUCARPIA Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding*, Lebeda, A. and Paris, H. S., Eds., Olomouc, Czech Republic, 12-17 July 2004, Palacky University in Olomouc, 507-514.