

**Proje No: 106O170**

**Ulusal Kavun (*Cucumis melo*) Koleksiyonlardaki Genetik  
Çeşitliliğin Belirlenmesi**

**DOÇ. DR. ANNE FRARY  
DOÇ. DR. SAMİ DOĞANLAR  
DOÇ. DR. TUNCER TAŞKIN  
DR. AYFER TAN  
ABDULLAH İNAL  
SEVGİ MUTLU**

**Haziran 2009**

**İZMİR**

## ÖNSÖZ

Bitki germplazm koleksiyonları bir ülkenin genetik kaynaklarını korumak ve biyoçeşitlilik sağlamak için gereklidir. Dünya'da 750'nin üzerinde genbankası vardır ve bu gen bankalarında muhafaza altına alınmış yaklaşık 3 milyon dolayında bitki tohum örnekleri (accessions) bulunmaktadır. Bu koleksiyonları uygun şartlarda muhafaza altında tutmak ve çoğaltmak son derece pahalı ve zaman gerektiren işlemlerdir. Her bir tohum örneğinin karakterizasyonu genelde mümkün değildir ve bunun sonucu olarak birbirinin aynı olan duplike hatlar bilinmeyerek muhafaza edilmektedir. Daha etkili germplazm idaresi tohum örneklerinin morfolojik ve genetik karakterizasyonunu, özgün germplazmlardan oluşan çekirdek (core) koleksiyonların korunabilmesi için zorunlu kılmaktadır. Bu şekilde yapılacak bir karakterizasyon ise bitki ıslahında kullanım için hatların daha etkili bir şekilde seleksiyonuna imkan sağlayacaktır. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü bünyesinde oluşturulan Ulusal Gen Bankası Türkiye'nin en büyük bitki germplazm koleksiyonlarına sahip bulunmaktadır. Bu koleksiyonlar içerisinde 300'ün üzerinde kavun yerel çeşitleri bulunmaktadır ve bu yerel çeşitler bu ürün için ikincil dereceden çeşitlilik merkezi olan Türkiye'nin değişik yörelerinden toplanmıştır. Kavun tohum örnekleri sadece minimum düzeyde karakterize edilmiştir. Önerilen bu projede, kavun hatları hem morfolojik olarak ve hemde moleküler işaretleyiciler kullanılarak genetik (yapısal) olarak karakterize edilmiştir. Genomik alanında yapılan yenilikler biyolojik sistemler hakkında daha önce hiç görülmediği kadar çok miktarda bilgi sağlamıştır. Paralel olarak, bilgi çağı (biyoinformatik alanında yapılan gelişmeler) verilerin depolanması, ulaşılması ve işlemi sırasında daha önce hiç görülmediği kadar çok büyük yetenek ve imkanlar sağlamıştır. Genomik ve biyoinformatik alanlarında gerçekleştirilen hızlı gelişmeler ise biyolojik olayların gene seviyesinde ortaya çıkarılması ve çalışılmasına imkan sunmuştur. Son yıllarda, moleküler markörlerin germplazm koleksiyonlarındaki çeşitliliği ölçmek ve karakterize etmek amacıyla kullanımında artan bir şekilde popüler hale gelmiştir. Örneğin moleküler markörler Yunan, Çin, İspanyol ve Amerikan kavun koleksiyonlarından tohum örneklerini incelemek için kullanılmışlardır. Önerilen araştırmadan elde edilen bilgiler kavun ıslah çalışmaları için çekirdek koleksiyonların oluşturulmasında ve Türkiye'nin kavun çeşitleri arasındaki ilişkileri ve genetik çeşitliliği tayin etmede önemli olacaktır.

Bu proje TÜBİTAK tarafından Doç. Dr. Anne Frary'ye sağlanan destekle tamamlanmıştır (TÜBİTAK 106O170).

## İÇİNDEKİLER

ÖZET	6
ABSTRACT	7
1. GİRİŞ	8
2. GENEL BİLGİLER	9
2.1. Kabakgiller ve Kavun	9
2.2. Kavun'da Genetik Çeşitlilik Çalışmaları	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM	11
3.1. Bitkisel Materyal	11
3.2. Morfolojik Karakterizasyon	11
3.3. Moleküler Karakterizasyon	13
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	18
4.1. Morfolojik Karakterizasyon Sonuçları	18
4.1.1.Genel Büyüme Karakterleri	23
4.1.2. Yaprak Karakterleri	24
4.1.3. Çiçek Karakterleri	25
4.1.4. Meyve Karakterleri	25
4.1.5. Tohum Karakterleri	28
4.1.6. Morfolojik Karakterler ile Yapılan Gruplama Analizleri	28
4.2. Moleküler Karakterizasyon Sonuçları	32
4.2.1. DNA İzolasyonu	32
4.2.2. SSR Analizleri	36
4.2.3. AFLP Analizleri	42
5. SONUÇLAR	55
EK-2: KAYNAKLAR	57
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU	59

## TABLO LİSTELERİ

Tablo 1. SSR Primer Listesi	14
Tablo 2. AFLP Primer Kombinasyonları Listesi	16
Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Kavun Genotiplerinin Listesi	18
Tablo 4. Çalışmada Kullanılan Yakın Akriba Türlerin Listesi	22
Tablo 5. DNA Kalitesi İçin Yapılan Nanodrop Sonuçları	33
Tablo 6. AFLP Primer Özellikleri	42
Tablo 7. AFLP primer Kombinasyonları Başına Düşen Polimorfik Band Sayısı	45

## ŞEKİL LİSTELERİ

Şekil 1. Serada Yetiştirilen Kavun Genotiplerinin Genel Görünüşleri	23
Şekil 2. Serada Yetiştirilen Kavun Genotiplerinin Genel Görünüşleri	23
Şekil 3. Kavun Genotiplerinin Erkek ve Dişi Çiçekleri Genel Görünüş	23
Şekil 4. Kavun Genotiplerinin Meyve Gelişimi Genel Görünüş	23
Şekil 5. Kavun Genotiplerinde Gözlenen Büyüme Şekli	24
Şekil 6. Kavun Genotiplerinde Gözlenen Yaprak Şekli ve Lobluluğu	24
Şekil 7. Kavun Genotiplerinde Gözlenen Yaprak Rengi	25
Şekil 8. Kavun Genotiplerinde Gözlenen Çiçek Yapıları	25
Şekil 9. Kavun Genotiplerinde Gözlenen Meyve Morfolojisi	26
Şekil 10. Kavun Genotiplerinde Gözlenen Homojen Meyve Morfolojisi Örneği	26
Şekil 11. Kavun Genotiplerinde Gözlenen Meyve Eti ve Rengi	27
Şekil 12. Kavun Genotiplerinde Bazı Morfolojik Karakterlerle yapılan Gruplama Analizleri	28
Şekil 13. Yaprak Karakterleri İçin Yapılan Gruplama Analizleri	30
Şekil 14. Meyve Karakterleri İçin Yapılan Gruplama Analizleri	31
Şekil 15. DNA Kalitesini ve Miktarını Gösteren Jel Resmi	32
Şekil 16. Polimorfik SSR Primerleri PCR Sonuçları	36
Şekil 17. Sekiz Kavun Örneğinde Test Edilen SSR Primerleri PCR Sonuçları	37
Şekil 18. DNA Analiz Cihazı İle Elde Edilen Lokus Uzunlukları	37
Şekil 19. SSR Sonuçlarına Göre Oluşturulan Filogenetik Ağaç	40
Şekil 20. SSR Sonuçlarına Göre Oluşturulan 2D Gösterimi	41
Şekil 21. SSR Sonuçlarına Göre Oluşturulan 2D Gösterimi	41

Şekil 22. Üç Kavun Örneği İle Yapılan ve Red Edilen AFLP Sonuçları	43
Şekil 23. Üç Kavun Örneği İle Yapılan ve Kabul Edilen AFLP Sonuçları	44
Şekil 24. AFLP Sonuçlarına Göre Oluşturulan Filogenetik Ağaç	47
Şekil 25. AFLP Sonuçlarına Göre Oluşturulan 2D Gösterimi	48
Şekil 26. AFLP Sonuçlarına Göre Oluşturulan 3D Gösterimi	49
Şekil 27. Türdışı Kabakgil Türleriyle AFLP Sonuçlarına Göre Oluşturulan Filogenetik Ağaç	50
Şekil 28. Türdışı Kabakgiller İle AFLP Sonuçlarına Göre Oluşturulan 2D Gösterimi	51
Şekil 29. İndirgenmiş Sayıda Kavun genotipi ve Türdışı Türler İle Yapılan Filogenetik Ağaç	52
Şekil 30. İndirgenmiş Verilerle Oluşturulan 2D Gösterimi	53
Şekil 31. İndirgenmiş Verilerle Oluşturulan 3D Gösterimi	54

## ÖZET

Türkiye kavun, hıyar, kabak ve karpuz gibi ürünleri içeren Kabakgiller ailesi için ikinci dereceden genetik çeşitlilik merkezidir. Bu türler için bir mikro çeşitlilik merkezi olarak önemli olmasına ilaveten Türkiye bu ürünlerin dünyadaki en büyük üreticilerinden biri durumundadır ve dünya kavun üretiminde ikinci sırada yer almaktadır. ETAE Ulusal Gen Bankası koleksiyonları ülke boyunca 48 değişik lokasyondan toplanmış 350 civarında kavun tohum örnekleri (accessions) içermektedir. Bu koleksiyonlar Türkiye'nin biyoçeşitliliğinin ve değerli genetik kaynaklarının korunmasını ve muhaza edilmesini sağlamaktadır. Bununla birlikte, germplazm idaresi (tohum örneklerinin çoğaltılması, yeniden üretilmesi ve muhafaza edilmesi), özellikle kavun gibi yüksek oranda yabancı dölllenme gösteren ve sarılgan bir büyüme şekline sahip olan ürünler için pahalıdır ve çok zaman ve yoğun işgücü gerektirmektedir. Son zamanlarda, çok sayıda araştırma moleküler markörlerin tek başlarına yada morfolojik karakterlerle birlikte germplazm karakterizasyonu ve idaresi için kullanılabilirlikleri üzerine yoğunlaşmıştır. Bu markörlerden elde edilen veriler koleksiyonlar içerisindeki genetik çeşitliliğin ve tohum örnekleri arasındaki genetik ilişkilerin belirlenmesinde kullanılabilir. Bu bilgiler sinonim yapıdaki (farklı isim altında özdeş genetik yapılar) çeşitlerin elimine edilmesine ve hononim yapıdaki (aynı isim altında farklı genetik yapılar) çeşitlerinde birbirinden ayırt edilmesine olanak sağlayacaktır. Bu şekilde, özgün materyaller çekirdek koleksiyonlar için belirlenebilmektedir. Bu tip çalışmalar, ayrıca, bitki ıslahı için toplanmış germplazmın kullanımına imkan sağlayacaktır. Önerilen projede, ulusal kavun koleksiyonu SSR ve AFLP markörleri ile genetik olarak karakterize edilmiştir. Morfolojik olarak farklı 30 tohum örneğinden oluşan bir grup genotip, markör polimorfizmini tayin etmek ve bütün koleksiyona uygulanacak tanımlayıcı bir grup SSR işaretleyicisini seçmek için, 50-100 adet işaretleyici ile surveylenmiştir. İlaveten, 250 tohum örneğinden oluşan bir grup hat bitki, çiçek, meyve ve tohum fenotiplerini tayin edecek 35 parametre kullanılarak morfolojik olarak karakterize edilmiştir. Genotipik ve fenotipik veriler ulusal koleksiyon içerisindeki çeşitliliğin miktarını tayin etmek, genotipler arasındaki genetik ilişkileri belirlemek ve bir çekirdek kavun germplazm koleksiyonunu tanımlamak amacı ile analiz edilmiştir. Ayrıca, bu veriler bireysel yerel çeşitleri ve kültür çeşitlerini ayırt etmeye ve her generasyon tohumları kontrol etmeye yarayacak kolay bir yol sağlayarak hat saflığını muhafaza etmeye yardımcı olmuştur. Bu proje ile üretilen bütün veriler ETAE Ulusal Gen Bankası Veri Tabanı Sistemleri içerisine entegre edilmiştir. Bu proje genomik ve biyoinformatik metodların ETAE Ulusal Gen Bankası mevcut germplazm idaresi teknikleri içerisine entegrasyonu için bir test projesidir. Türkiye aralarında tahıllar ve meyve gibi çok sayıda bitki türünün birinci dereceden çeşitlilik merkezi olması nedeniyle önerilen projede kullanılan metodlar potansiyel olarak çok değişik çeşitlilikte bitki materyallerine de uygulanabileceği gösterilmiştir. Bu çalışma Türkiye'nin değer biçilemez genetik kaynaklarının daha etkili ve hızlı belirlenmesi, toplanması, çoğaltılması ve korunmasına imkan sağlayacaktır.

**ANAHTAR KELİMELER:** *Cucumis melo*, Genetik çeşitlilik, Çekirdek Koleksiyonlar, SSR, AFLP

## **ABSTRACT**

Turkey is a secondary center of diversity for cucurbits, the plant family that contains melon, cucumber, squash and watermelon. In addition to the country's importance as a microcenter of diversity for these species, Turkey is a major producer of these crops and ranks second in worldwide melon production. The National Germplasm Collection at Aegean Agricultural Research Institute contains 351 accessions of melon collected from 48 sites throughout the country. This collection helps to preserve and protect Turkey's biodiversity and valuable genetic resources. However, germplasm management (maintenance and propagation/reproduction of accessions) is expensive, time-consuming and labor intensive, especially for a crop like melon which has a vining growth habit and a high rate of cross pollination. Recently, much research has focused on the implementation of molecular markers, alone and in combination with morphological traits for germplasm characterization and management. Data generated from these markers can be used to determine genetic diversity within a collection and genetic relationships among accessions. Such information allows the elimination of synonymous accessions (lines which are genetically the same but have different names) and the separation of homonymous accessions (lines which have the same name but are genetically distinct). In this way, unique material can be identified for core collections. Such work also facilitates the use of collected germplasm for crop improvement. In the proposed research, 239 lines from the national melon collection were genetically characterized with simple sequence repeat (SSR) and AFLP markers. In addition, these lines were morphologically characterized using 35 parameters that assess plant, flower, fruit and seed phenotypes. The genotypic and phenotypic data were analyzed to assess the extent of diversity within the national collection, to determine genetic relationships among the lines and to define a core collection of melon germplasm. The data has also helped to distinguish individual landraces / cultivars and help to maintain line purity by providing an easy way to check seeds each generation. Collection of new lines will also be facilitated by the ability to distinguish among and measure diversity among cultivars/landraces. All of the data generated by the project has been integrated into the Aegean Agricultural Research Institute National Gene Bank database. This project is a test case for the integration of genomic and bioinformatic methods into current germplasm management techniques at the Aegean Agricultural Research Institute National Gen Bank. As Turkey is a center of diversity for many crops including cereals and fruit trees, the methods used in the proposed research could potentially be applied to a wide variety of plant material. Such work should allow for more effective and efficient identification, collection, propagation and preservation of Turkey's invaluable genetic resources.

**KEYWORDS:** *Cucumis melo*, Genetic Diversity, Core Collections, SSR, AFLP

## 1. Giriş

Türkiye bitkisel çeşitlilik ve genetik kaynakları (kültüre alınmış türler, bu türlere ait yerel çeşitler, bu türlerin yabani akrabaları ve primitif formları) bakımından dünya'daki en önemli merkezlerden biridir. Ancak, çevresel ve diğer nedenlerle mevcut genetik kaynaklarımız gün geçtikçe erozyona uğramakta ve tamamen kaybolma tehlikesi ile karşı karşıya kalmaktadır. Sürdürülebilir tarımsal üretim için genetik kaynaklardaki çeşitliliğin korunması ve muhafazası son derece önem arz etmektedir. Ülkemiz genetik kaynakları ulusal ve uluslararası düzeylerde 1920'li yıllardan itibaren toplanmaya başlanmış ve dünya gen bankalarında muhafaza altına alınmıştır. 1964 yılından itibaren Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde oluşturulan Bitki Araştırma ve İntrodüksiyon merkezinde özellikle ülkemizde tarımı yapılan bitki türlerinin toplanması ve muhafazası işlemlerine başlanmıştır. 1980'li yıllardan itibaren bir çok bitki türlerinde (pancar, tütün, nohut, mısır, buğday vb.) morfolojik karakterizasyon ve değerlendirme çalışmalarına başlanmıştır. Cucurbitaceae ailesine ait türlerde gen bankası tarafından toplanan ve karakterize edilen türler arasında yer almaktadır.

Cucurbitaceae ailesine ait bitki türleri ülkemiz sebze tarımında önemli bir yer tutmaktadır. Cucurbitler ülkemiz toplam sebze üretiminin %31'ini karşılamaktadır. Bu türler arasında en fazla üretimi yapılan ürün karpuz olup toplam olarak yılda 4 milyon ton üretilmektedir. Bu ürünü sırasıyla 1.8 milyon ton/yıl ile kavun, 1.75 milyon ton/yıl ile hıyar ve 0.3 milyon ton/yıl ile kabak takip etmektedir. Ülkemiz 1.800.000 ton ile dünya kavun üretiminin % 6'sını karşılamakta ve Çin'den sonra 2. sırada yer almaktadır (FAO 2007). Ekonomik önemi çok olmayan diğer bazı Cucurbit türlerinde de değişen miktarlarda üretimler yapılmaktadır. Ülkemizde bu ailenin kültüre alınmış türleri arasında *Citrullus lanatus* (karpuz), *Cucumis sativus* (hıyar), *Cucumis melo* (kavun), *Cucumis flexuosus* (acur), *Cucurbita maxima* (kestane kabağı), *Cucurbita moschata* (bal kabağı) ve *Cucurbita pepo* (kabak) yer almaktadır. Ayrıca, *Lagenaria siceraria* (su kabağı), *Luffa cylindrica* (lif kabağı) ve *Momordica charantia* (kudret narı) gibi minor öneme sahip türlerde daha az miktarlarda yetiştirilmektedir. Türkiye cucurbitlerin orijin merkezi olmadığından *Cucumis*, *Cucurbita*, *Citrullus* ve *Lagenaria* gibi genara'ların yabani türlerine ve formlarına rastlanmamaktadır. Fakat, Anadolu'da kavun, karpuz, kabak ve ajur gibi ürünler için çok zengin genetik çeşitlilik bulunmuştur. Aralarında cucurbit'lerinde bulunduğu ve Anadolu'ya özgün olmayan pek çok bitki grubunda mikromerkez çeşitliliği belirlenmiştir. Ülkemizde günümüze dek yapılan çalışmalarda 1700 civarında cucurbit germplazmaları toplanmış ve ETAE bünyesindeki Ulusal Gen Bankası'nda muhafaza altına alınmıştır (KÜÇÜK 2002). Ulusal Gen Bankası tarafından toplanan Cucurbitaceae tohum örnekleri (accessions) üzerinde morfolojik karakterler bakımından sistematik olarak değerlendirme ve karakterizasyon çalışması yapılmamıştır.

Yakın akraba türler arasında veya bir tür içerisindeki bireyler arasındaki genetik çeşitlilik kıyaslamaları tarihsel olarak fenotipik karakterler kullanılarak yapılmakta iken son zamanlarda moleküler genetik markörlerde genetik çeşitliliğin belirlenmesinde yoğun ve rutin bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Moleküler markörler genom içerisinde herhangi bir bölgede bulunan özgün lokuslar arasındaki farklılığı ortaya koyarlar. Fenotipik analizler iki açıdan zorlukları olan analizlerdir: (1) Birçok karakterin ifadesinde / ortaya çıkmasında (*expression*) çevre faktörlerinin büyük oranlardaki etkisi, (2) ölçülebilecek muhtemel karakterlerin sınırlı sayıda olması ve bu karakterler arasındaki belirgin farklılıkların



(*polymorfizm*) sınırlı düzeyde olması. Bu iki zorluk bir çok bitki türünde yapılan çalışmalarda kaçınılmaz hatalara ve zayıf sınıflamalara sebep olmuştur. Moleküler markörler germplazmların karakterizasyonunda fenotipik analizlere göre avantajlara sahiptir. Moleküler markörler kullanılarak yapılan karakterizasyon çalışmalarından elde edilen bilgiler paylaşılmış pedigrilerin takibinde veya bireylerin jeografik orijinlerinin daha iyi tahmin edilmesinde ve fonksiyonel karakterizasyon analizlerini (markörler ve fenotipler arasındaki ilişkileri türünden) etkileyecek populasyon yapılarını ortaya çıkarmaya yardımcı olacaktır. Moleküler markörler kullanılarak yapılan yapısal (genetik) karakterizasyon çalışmaları herhangi bir detaylı genomik çalışmanın ilk kritik aşamasıdır. Önerilen bu projede çalışma konusu olarak ülkemizde ekonomik öneme sahip bitki gruplarından biri olan Cucurbitaceae ailesi (Kabakgiller) *Cucumis* türlerine ait kavun tohum örneklerinin morfolojik ve moleküler olarak karakterizasyonu ele alınmıştır.

## 2. Genel Bilgiler

Genetik kaynakların yok olmadan gen bankalarında muhafaza altına alınması bir ülkenin sürdürülebilir tarımı için son derece önemlidir. Özellikle gen kaynaklarının toplanması ve tarımsal üretime katkı sağlaması konularında uluslararası düzeyde çok önemli çalışmalar yapılmaktadır. Bu konuda ülkemizde bazı ürün gruplarında çalışmalar bulunmaktadır ve bu çalışmaların ekonomik ve tarımsal öneme sahip bütün ürün gruplarında yapılması ülke tarımının geleceği açısından önem arz etmektedir. Önerilen bu projenin genel kapsamında Türkiye’de ekonomik öneme sahip ürünlerden biri olan Cucurbitaceae ailesi *Cucumis melo* türünde karakterizasyon çalışmaları yer almaktadır. *Cucumis* türleri için Türkiye birinci dereceden orijin merkezi (center of origin) olmamasına rağmen ülkede yetiştirilmiş ve/veya yetiştirilmekte olan yerel ve kültür çeşitlerinde son derece büyük boyutlarda morfolojik çeşitliliğe rastlanmaktadır. Morfolojik düzeyde görülen çeşitliliğin genetik (yapısal) esaslarının belirlenmesi ise bu çalışmanın kapsamında yer almaktadır. Bu amaçla *Cucumis melo* türüne ait yaklaşık 239 tohum örneğinde SSR ve AFLP markörleri kullanılarak genetik karakterizasyon yapılmıştır. Ayrıca, morfolojik olarak büyük farklılık gösteren tür olan kavun (*Cucumis melo*) tohum örneklerinde morfolojik olarak karakterizasyon yapılmıştır.

### 2.1. Kabakgiller ve Kavun

Kavun üretimi bakımından Türkiye yıllık 1.800.000 ton (%6.7 si) üretim miktarıyla Çin’den sonra (13.700.000 ton üretmektedir) ikinci sırada yer almaktadır (FAO 2007). Kabakgiller (Cucurbitaceae) yaklaşık 100 cins ve 750’den fazla tür içeren bir ailedir (NG 1993). Aile içerisinde aralarında kavun, hıyar, karpuz, kabak ve bal kabağı gibi ekonomik öneme sahip bir çok ürün yer almaktadır. Kavun ve hıyar her ikisi *Cucumis* (sırasıyla, *Cucumis melo* and *Cucumis sativus*) genus’una aittir. Bu genus içerisinde acur (*Cucumis flexuosus*) gibi daha az bilinen diğer bazı türlerde yer almaktadır. Kavun ve Karpuz’un orijin merkezinin Afrika olduğu düşünülmektedir. Hıyar bitkisinin ise Hindistan’da ortaya çıktığı ve geniş yayılımlar gösterdiği belirtilmiştir (ROBINSON ve DECKER-WALTERS 1997). Türkiye’nin kabakgiller türleri için bir mikromerkez (HARLAN 1951) veya ikincil genetik çeşitlilik merkezi (PITRAT ve ark. 1999) olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak, ülkede kabakgillerin yabani türleri ve formları olmamasına rağmen, Türkiye halen kabakgil germplazmları bakımından çok geniş bir çeşitliliğe sahiptir (KUCUK ve ark. 2002). Kavun ve hıyar yerel çeşitleri halen değişik bölgelerimizde yetiştirilmekte olup geniş morfolojik ve tat/lezzet farklılığı göstermektedir (KUCUK ve ark. 2002). Bu çok geniş farklılık gösteren *Cucumis* germplazmları

toplanmış ve ETAE bünyesinde oluşturulan Ulusal Gen Bankasında muhafaza altına alınmıştır. Ulusal Gen Bankasında 300'ün üzerinde kavun ve muskmelon, 200'ün üzerinde hıyar ve 52 adet ajur tohum örneği bulunmaktadır (KUCUK ve ark. 2002).

## 2.2. Kavunda Genetik Çeşitlilik Analizleri İle İlgili Önceki Çalışmalar

Son zamanlarda, moleküler işaretleyiciler kullanılarak farklı orijinlerden kabakgil türleri germplazmalarında genetik çeşitliliği tayin etmeye yönelik ilgi giderek artmaktadır. Çalışmalar Afrika (MLİKİ ve ark. 2001), İspanya (LOPEZ-SESE ve ark. 2002) ve Yunan (STAUB ve ark. 2004) orijinli kavun tohum örnekleri arasındaki genetik çeşitliliği ve filogenetik ilişkileri incelemiştir. Diğer araştırmalar Amerika (MEGLIC ve ark. 1996), Hindistan (STAUB ve ark. 1997), Çin (STAUB ve ark. 1999) ve Afrika (MLIKI ve ark. 2003) orijinli hıyar germplazmalarındaki genetik çeşitliliği karakterize etmiştir. Bu çalışmalar morfolojik verilerle birlikte değerlendirildiğinde ulusal germplazm koleksiyonlarındaki mevcut çeşitliliği karakterize etmede, çekirdek (*core*) koleksiyonların oluşturulmasında ve belirli jeografik bölgelerdeki genetik erozyonun derecesini tayin etmede oldukça yararlıdır. Yerel çeşitlerin korunmasına, yerel ve bölgesel biyo çeşitlilik sağlamada ve ürünlerin genetik tabanlarının genişletilmesinde önemli olduğu için, özel bir önem verilmelidir.

Değişik tip moleküler işaretleyiciler Kavun'da genetik çeşitlilik belirleme çalışmalarında uygulanmıştır. İzoenzimler (isozymes) ilk kullanılan fakat genellikle düşük polimorfizm gösteren işaretleyicilerdir (PERL-TREVES ve ark. 1985, STAUB ve ark. 1987, KNERR ve ark. 1989, KNERR ve ark. 1992). Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmleri (RFLP - Restriction fragment length polymorphism) işaretleyicileri oldukça polimorfik bulunmuştur (DIJKHUIZEN ve ark. 1996, NEUHAUSEN ve ark. 1992, GARCIA-MAS ve ark. 2000) fakat çok zaman gerektiren ve iş yükü fazla olan işaretleyicilerdir. PCR'a dayalı işaretleyici sistemleri kullanımlarının kolaylığı, hızlılığı ve çok az DNA gerektirmesinden dolayı artan bir şekilde popüler olmaya başlamışlardır. Kavun ve Hıyar'da uygulanan PCR'a dayalı sistemler arasında Rastgele amplifiye edilen polimorfik DNA (RAPD – randomly amplified polymorphic DNA), Amplifiye edilmiş parça uzunluk polimorfizmleri (AFLP – amplified fragment length polymorphism) ve mikrosatellit (SSR)'ler yer almaktadır. RAPD'ler hem kavun ve hem hıyar'da başarılı bir şekilde kullanılmıştır (GARCIA-MAS ve ark. 2000, MLIKI ve ark. 2001, LOPEZ-SESE ve ark. 2002, MLIKI ve ark. 2003, LOPEZ-SESE ve ark. 2002, STAUB ve ark. 2004). Ama, yeniden üretilebilirliklerinde zorluklar olabilir. Mevcut bilgilerimize göre, AFLPs sadece kavun'da yapılan bir çalışmada kullanılmıştır ve hem RFLP ve hemde RAPD'lerden daha etkili oldukları bulunmuştur ve RAPD'lere göre yeniden üretilebilirlikleri daha iyi durumdadır (GARCIA-MAS ve ark. 2000). SSR'larda kavun ve hıyar tohum örnekleri için uygulanmıştır. Daha yüksek seviyede polimorfik olmaları ve yeniden üretilebilirlikleri bakımından RAPD'lerden daha iyi oldukları belirlenmiştir (BAUDRACCO-ARNAS ve PITRAT 1996, KATZIR ve ark. 1996, DANIN-POLEG ve ark. 2001, LOPEZ-SESE ve ark. 2002, MONFORTE ve ark. 2003) ve ayrıca RFLP'lerden daha çok allel belirlemektedirler (DANIN-POLEG ve ark. 2001). SSR işaretleyicileri hem kavun ve hem hıyar için geliştirilmiştir. 46 adet SSR işaretleyicisi bir *Cucumis melo* genomik DNA kütüphanesinden (DANIN-POLEG ve ark. 2001) ve ayrıca 120 civarında SSR işaretleyicisi ise *Cucumis sativus* DNA kütüphanesi ve veritabanlarında depolanmış sekanzlardan geliştirilmiştir (DANIN-POLEG ve

ark. 2001, STAUB ve ark. 2005). Bir çalışmada, kavun SSR'lerinin % 86'sının 13 adet kavun tohum örnekleri polimorfik oldukları saptanmışken hıyar SSR'lerinin %80'inin 11 hıyar tohum örneğinde polimorfik olduğu bulunmuştur (DANIN-POLEG ve ark. 2001). Ayrıca, çalışmalar kavun ve hıyar için geliştirilmiş SSR markörleri arasında iyi bir derecede cross homology olduğunu göstermiştir (KATZIR ve ark. 1996, DANIN-POLEG ve ark. 2001). Örneğin, DANIN-POLEG ve ark. (2001) kavun SSR'lerinin %37'sinin hıyarda ve hıyar SSR'lerinin %40'ının kavunda polimorfik olduğunu bulmuştur. İlâveten, SSR markörleri tatlı yenilebilir ve egzotik çeşitlerden oluşan iki grup kavun arasında ve iki hıyar alttürü (*sativus* karşı *hardwickii*) arasında filogenetik analizlerde faydalı oldukları bulunmuştur (DANIN-POLEG ve ark. 2001).

Önerilen araştırmada, kavun ve hıyar için yayınlanmış bir grup SSR markörü ulusal germplazm koleksiyonlarındaki yaklaşık 250 kavun (*Cucumis melo*) tohum örneğinde taranmıştır. Elde edilen veriler (1) koleksiyonlardaki genetik çeşitliliği tayin etmede, (2) filogenetik ilişkilerin saptanmasında ve (3) çekirdek koleksiyonların belirlenmesinde kullanılmıştır. Ayrıca, morfolojik veriler 250 *Cucumis melo* tohum örnekleri için toplanmıştır. Bu veriler genetik çeşitlilik ve ilişkilerin tayini için ayrıca kullanılmıştır. *Cucumis* türleri içerisinde morfolojik olarak en çok farklılık gösteren tür kavun (KIRKBRIDE 1993) olduğu için kavun tohum örnekleri morfolojik ve moleküler olarak karakterize edilmiştir. Projenin esas amacı kabakgiller ailesi *Cucumis* türleri germplazm idaresi için bir veritabanı (*database*) oluşturmaktır. Bu veritabanı çalışma sonucunda toplanacak morfolojik bilgileri her bir genotip için çekilen resimler (*image*) ile birlikte entegre edecektir. İlâveten, genetik karakterizasyonda kullanılacak bir grup SSR moleküler mrkörü kavun için geliştirilmiştir. Bu mrkörler Türkiye'de yayılım gösteren ve ulusal gen bankasındaki koleksiyonlarda muhafaza edilen *Cucumis melo* türündeki mevcut genetik çeşitliliğin yapısal (genetik) analizinde kullanılmıştır. Elde edilen moleküler veriler oluşturulacak veritabanına entegre edilmiştir. Bu koleksiyonlardaki mevcut varyasyonun / çeşitlilik morfolojik ve moleküler olarak karakterizasyonu sonucu *Cucumis* türleri için hemen hemen bütün ıslah objektiflerine yönelik yeni çözümler üretecek ham kaynaklar (genler) ortaya çıkarılacaktır.

### **3. Gereç ve Yöntem**

#### **3.1. Bitkisel Materyaller**

Denemede kullanılacak kavun genotipleri (tohum örnekleri) Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Ulusal Gen Bankası, Menemen, İzmir'den temin edilmiştir. *Cucumis melo* türünü temsilen 23 değişik yöreden toplanmış 250 adet kavun genotipleri (tohum örnekleri) denemelerde kullanılmıştır.

#### **3.2. Morfolojik Karakterizasyon**

Kavun (*Cucumis melo*) bitkilerinin sera koşullarında yetiştirilmeleri sırasında çok yer kaplamaları, yabancı döllen bir bitki türü olması ve elle kendilemenin zorunluluğu gibi sebeplerle iş yükünün çok olmasından dolayı morfolojik karakterizasyon çalışmaları sadece 35 morfolojik karakter için yapılmıştır. Çalışmada International Plant Genetics Research Institute (IPGR)'in kavun için yayınlamış olduğu kavun tanımlama listesi kullanılmıştır. Gözlemler her bir genotipi temsilen 10 adet bitkide yapılmıştır. İncelenecek morfolojik karakterler ve değerlendirme sistemleri aşağıda verilmiştir:

1. Fide gücü (3 zayıf, 5 orta, 7 güçlü)

2. Bitki büyüme şekli (1 kısa, 2 cüce, 3 sınırlı uzayan, 4 orta, 5 çok dallı)
3. Boğumarası uzunluğu (1 çok kısa, 2 kısa, 3 kısa-orta, 4 orta, 5 uzun)
4. Bitkide dallanma
5. Yaprak şekli (1 tam, 2 üç loblu, 3 beş loblu, 4 derin üç loblu, 5 derin beş loblu)
6. Yaprak lobluluğu (3 yüzeysel, 5 orta, 7 derin)
7. Ortadaki yaprak lobunun şekli (1 geniş oval, 2 yüzeysel dikdörtgen, 3 dikdörtgen, 4 elips)
8. Yaprak rengi (1 açık yeşil, 2 yeşil, 3 koyu yeşil, 4 karışık)
9. Yaprak sapı tüylülüğü (1 çok seyrek, 2 tüylü, 3 çok tüylü, 4 geriye dönük,yatık tüylü, 5 yünsü)
10. Yaprak dayanıklılığı
11. Yaprak yaşlanması (3 hafif yaşlanma, 5 orta yaşlanma, 7 tam yaşlanma)
12. Çiçek tipi (1 monoik, 2 andromonoik, 3 ginoik, 4 erkek kısır, 5 dişi kısır)
13. %50 çiçeklenme gün sayısı
14. Çiçek rengi (1 beyaz-sarı, 2 sarı-krem, 3 sarı, 4 koyusarı, 5 turuncu, 6 yeşil)
15. Ovaryum tüy uzunluğu (1 kısa(<1cm), 2 orta (1-5cm), 3 uzun(>5 cm))
16. Ovaryum tüylenme tipi (1 yaygın tüylü, 2 az tüylü)
17. Meyve şekli (1 yuvarlak, 2 düz, 3 basık, 4 eliptik, 5 armut şekilli, 6 oval, 7 palamut, 8 uzun, 9 scallop şekilli)
18. Meyve uzunluk/genişlik oranı
19. Olgunlaşma zamanı
20. Meyve zemin rengi (1 beyaz, 2 açık sarı, 3 krem, 4 soluk yeşil, 5 yeşil, 6 koyu yeşil, 7 siyah-yeşil, 8 turuncu, 9 kahverengi, 10 gri)
21. İkincil meyve rengi (1 beyaz, 2 açık sarı, 3 krem, 4 soluk yeşil, 5 yeşil, 6 koyu yeşil, 7 siyah-yeşil, 8 turuncu, 9 kahverengi, 10 gri)
22. İkincil meyve kabuk rengi deseni (0 yok, 1 benekli (<0,5cm), 2 noktalı (>0,5cm), 3 çizgili, 4 kısa çizgili (<4cm), 5 uzun çizgili (>4cm))
23. Meyve yüzeyi (1 düz, 2 damarlı, 3 yüzeysel kırışık, 4 derin kırışık, 5 yüzeysel dalgalı, 6 az siğilli, 7 çok siğilli, 8 az ağılı, 9 çok ağılı , 10 dikişli)
24. Meyve boyu (cm)
24. Meyve eni (cm)
25. Meyve ağırlığı (g) (1 çok küçük (<100), 2 çok küçük-küçük (100-300), 3 küçük (300-600), 4 küçük-orta (600-1000), 5 orta (1000-1400), 6 orta-büyük (1400-1800), 7 büyük(1800-2200), 8 büyük-çok büyük (2200-3000), 9 çok büyük (>3000))
26. Çiçek burnu şekli (1 çukur, 2 düz, 3 yuvarlak, 4 sivri)
27. Gövde sonu şekli (1 çukur, 2 düz, 3 yuvarlak, 4 sivri)
28. Meyve eti kalınlığı (cm)
29. Meyve eti rengi (1 beyaz, 2 sarı, 3 krem, 4 mat yeşil, 5 yeşil, 6 mat turuncu, 7 turuncu, 8 pembe-kırmızı)
30. Meyve eti yapısı (1 düz-sıkı, 2 kumlu-sıkı, 3 yumuşak, 4 kuru, 5 lifli-jelatinimsi, 6 lifli-kuru)
31. Olgun meyve acılığı (3 düşük, 5 orta, 7 yüksek)
32. Meyve tadı (3 tatsız, 5 orta, 7 tatlı)

33. Tohum büyüklüğü (1 çok küçük (<5mm), 2 küçük (5-8mm), 3 orta(9-12mm), 4 geniş (13-16mm), 5 çok geniş (>16mm))
34. Tohum şekli (1 yuvarlak, 2 eliptik, 3 oval, 4 üç köşeli, 5 çam tohumu gibi)
35. 100 tohum ağırlığı (g)

### 3.3. Moleküler Analizler

Genetik analizler için her bir kavun genotipini temsilen enaz 10 bitki sera koşullarında yetiştirilmiştir. Genomik DNA'lar 2-3 yapraklı devreye gelen her fideden alınan taze yapraklardan FULTON ve ark. (1995) tarafından tanımlanan mini-preparation yöntemi kullanılarak veya gerekli görüldüğü durumlarda Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kiti kullanılarak çıkarılmıştır. Çıkarılan DNA'lar eşit konsantrasyonlara getirilerek bir örnek (havuz) haline getirilmiştir. Genetik karakterizasyon çalışmasında kullanılan SSR ve AFLP metodları PCR'a dayalıdır. Moleküler analizler için kavun ve hıyar için geliştirilmiş yaklaşık 170 civarındaki SSR işaretleyicisinden her iki üründe de çalışabilen 50 adeti seçilmiştir. SSR markörleri daha önceki yapılan çalışmalarda belirlenmiş ve kavun'da haritalanmıştır (GONZALO ve ark. 2005). Bütün kavun genomunu kapsamak için her bir kromozomdan 3-5 işaretleyici seçilmiştir. Tablo 1 çalışmada kullanılmak üzere seçilen SSR markörlerinin kromozom lokasyonlarını ve primer sekanzlarını listelemektedir. Bu SSR'ların toplam uzunluğu 27 nükleotid civarındadır. SSR lokusların PCR amplifikasyonu daha önceden KATZIR ve ark. (1996) tarafından tanımlanan yöntem esas alınarak yapılmıştır. SSR işaretleyicileri için, PCR reaksiyonları müteakip şekilde yapılmıştır: 25 µl reaksiyon karışımı içerisinde 1 µl DNA (40-60 ng/µl), 2.5 µl 10X PCR tampon çözeltisi (1x), 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 polymerase enzimi (0.25 U) ve 19.75 µl sterile dH<sub>2</sub>O içermektedir. PCR reaksiyonları GeneAmp®PCR System 9700 PCR cihazı kullanılarak yapılmıştır. SSR markörleri için PCR işlemi, hazırlanan karışım PCR cihazında 94°C'de 5 dakika tutulduktan sonra her bir döngü; 94°C'de 30 saniye, 50 veya 55°C'de 45 saniye, 72°C'de 45 saniye tutularak 35 döngü yapılmıştır. Son döngüden sonra örnekler 72°C'de 5 dakika tutularak işlem tamamlanmıştır. PCR ürünleri ileriki analizler yapılınca kadar 4°C de tutulmuştur. Elde edilen PCR ürünleri mümkün olduğunca agarose jelde elektroforez edilerek ayrıştırılmıştır. PCR ile elde edilen ürünler arasındaki uzunluk farklarını belirlemek için örneklerin hepsi 1 x TBE tampon çözeltisi kullanılarak hazırlanan 2-4% agaroz jelde yürütülmüştür ve dökümantasyon sistemi kullanılarak görüntülenmiştir. Bu yolla ayrıştırılamayan SSR'lar Beckman CQE-8800 DNA Analiz Sisteminde kapillar olarak ayrıştırılmıştır. Bu amaç için SSR primer'larından biri Beckman tarafından geliştirilen özel bir boya (WellRed Dye) ile işaretlenmiştir. İşaretlenen bu SSR primerlerinin 5' ucuna SCHUELKE (2000) tarafından tanımlanan florasan özelliğe sahip M13(-21) sekans kuyruğu (TGTAACGACGGCCAGT) eklenmiştir. M13(-21) eklenen bu primerler Integrated DNA Technologies, Inc. (Iowa, USA) den temin edilmiştir. Bu amaç için kullanılacak SSR lokusların PCR amplifikasyonu daha önceden KATZIR ve ark. (1996) tarafından verilen yöntemle yapılmıştır. Tek fark PCR reaksiyonuna WellRed işaretli primer ve işaretli karşılığı girmiş olmasıdır. Bu yolla çoğaltılan lokuslar, etanol presipitasyonu yoluyla (mikrosatellit için, ucuz ve güvenli bir purifikasyon yöntemidir) temizledikten sonra, örnek 40 ul civarında formamidli çözelti içinde süspanse edilmiştir. Bu hacime kabaca 0.5 ul gibi Beckman size standart 400 yada 600 örneğinde ilave edildikten sonra PCR ürünü CEQ8800 sisteminde okutulmuştur. Cihazda mevcut olan otomatik metodlardan uygun olanı seçilerek datanın kaydı sağlanmıştır.

Tablo 1. Kavun genotiplerinin moleküler karakterizasyonunda kullanılan SSR primerleri, sekanzları, kromozom pozisyonları ve polimorfizm durumları

İşaretleyici İsmi	İleri (F) Primer Sekanzları	Geri Primer Sekanzları	Kromozom	Polimorfik
CMACC146	TGTA AACGACGGCCAGTCA ACCACCGACTACTAAGTC	CGACCAAACCCATCCGATAA	1	NP
CMAT141	TGTA AACGACGGCCAGTAAGCACACCACCACCCGTAA	GTGAATGGTATGTTATCCTTG	1	NP
CMGAN25	TGTA AACGACGGCCAGTAGCCAATGTGAAGGATGAACA	TGCAATTAGCCTCTTCTCTA	1	NP
CMTCN56	TGTA AACGACGGCCAGTCTTTTCTCTTCTTCTATTCTC	ATCCAAAAGGAATCGGAAAAG	1	NP
TJ3	TGTA AACGACGGCCAGTTGGGCCTACGCTACAACTT	AGCAGCACAAAAGCACTTCA	1	NP
CMCTN5	TGTA AACGACGGCCAGTCACCTTAAAGTTTAGCCCC	AAAAATGCAATGAACTGAGCGC	2	P
CMTA170a	TGTA AACGACGGCCAGTTTAAATCCCAAAGACATGGCG	AGACGAAGGACGGTTAGCTTT	2	NP
CMTCN66a	TGTA AACGACGGCCAGTCTCCGATCAATTTTACATCT	GAATAAACTTGGTGCCAAC	2	P
TJ10	TGTA AACGACGGCCAGTACGAGGAAAACGCAAATCA	TGAACGTGGACGACATTTTT	2	P
TJ31	TGTA AACGACGGCCAGTGAGGCCTCCTCAGCTCTACA	AGCCATTAGCACAAGCTGA	2	P
CMAGN75	TGTA AACGACGGCCAGTTGGGTTTTCTTCTACTACTG	TGCTTTTACTCTCATTCAAC	3	P
CMCAN90	TGTA AACGACGGCCAGTCTAACGCTGACCCAACTCTC	GTGGTTGTGAGTTATGAGGAG	3	P
CMGA15	TGTA AACGACGGCCAGTCGGCAAGACGATTGGCAGC	ATCACCGTAGCGAAGCACC	3	NA
CMGAN21	TGTA AACGACGGCCAGTGCTGTA AACGAAACGGAGA	CGATCTTCTTTATTCTTCGCC	3	P
CMTCN30	TGTA AACGACGGCCAGTGGAGGAAAGGAAAGAGAGA	GGCAAGAAGATGGCAAAGAT	3	NA
CMAGN61	TGTA AACGACGGCCAGTGGAGACACAAGGAATATGTG	ATAACAAAGGGGCATAACAC	4	NP
CMATN101	TGTA AACGACGGCCAGTGCTTGTCTTTGTGTTTGC	GAGAACAAGACTCCTTAATCC	4	NP
CMCTN2	TGTA AACGACGGCCAGTCTGAAAGCAGTTTGTGTGCGA	AAAGAAGGAAGAGGCTGAGA	4	P
CMCTN35	TGTA AACGACGGCCAGTCCAATAATGTAATCGTCTTGG	GTTCCAACTTTCTACCAATCA	4	P
CMTAN100	TGTA AACGACGGCCAGTCGAATCTCCGGAACAGACAC	CCGTCTACAAGCGTGACTGTC	4	NP
CMATN89	TGTA AACGACGGCCAGTCACTACCTTAAACAGAATTG	GGACAATTTAGGGAGGATC	5	P
CMGA104	TGTA AACGACGGCCAGTTTACTGGTTTTGCCGATTT	AATTCGGTATTCAACTCTCC	5	NP
CMGAN12	TGTA AACGACGGCCAGTTTTTTGTGCTTATATGAGGG	GTTGCATAATGCTAATTTGG	5	P
CMTC160a+b	TGTA AACGACGGCCAGTGTCTCTCTCCCTTATCTTCCA	GATGGTGCCTTAGTTGTTCCG	5	NP
CMTCN62	TGTA AACGACGGCCAGTAAGATCGCCTCTATCACAG	ATTTGTACTCCCAACGCATC	5	NP
CMCT505	TGTA AACGACGGCCAGTGACAGTAATCACCTCATCAAC	GGGAATGTA AATTGGATATG	6	P
CMCTN4	TGTA AACGACGGCCAGTAAAACAAAAGCTCTCCACGA	CTTTCCTTTATTATGCCTACG	6	P
CMCTN86	TGTA AACGACGGCCAGTGTGACAGTTATCAAGGATGC	AAGGGAATGCATGTGGAC	6	P
TJ26	TGTA AACGACGGCCAGTGGAGATTGGTGCTGTCCTTC	CAAACGCAAATTGACCAAA	6	NP
TJ27	TGTA AACGACGGCCAGTAAGCGGAACAAGCTCATCTC	CAAAGCATCAATTGCTTGAA	6	NP
CMATN22	TGTA AACGACGGCCAGTCGGCAATCATCTTATCTTTC	AAGATTGAAGTGGGAAAATG	7	NP
CMCTN7	TGTA AACGACGGCCAGTAATGACACTGCCACATTCT	AGGTTTTTCAATGGAGGGGA	7	NP

CMTC47	TGTA AACGACGGCCAGTGCATAAAAGAATTTGCAGAC	AGAATTGAGAAGAGATAGAG	7	NP
CMAGN68	TGTA AACGACGGCCAGTGGAAGGAAATTAGCATGCAC	GCCACTCTGTCTTTCTTCC	8	NP
TJ24	TGTA AACGACGGCCAGTAAACACGGGCTTGAAGAAAA	CCCAGAAGGTGAGAGAGACCT	8	NP
CMCTN65	TGTA AACGACGGCCAGTTTAGGTGTATTTGATCTC	AATTTTATGGCTCAAGGTTC	9	NP
CMCTN71	TGTA AACGACGGCCAGTCAATTTTTGCCAAACAAGC	CAAGGACACAGATTTAATAC	9	P
CMGA165	TGTA AACGACGGCCAGTCTTGTTTCGAGACTATGGTG	TTCAACTACAGCAAGGTCAGC	9	NP
CMTCN67	TGTA AACGACGGCCAGTTCTCTTACAACCTTTGTCTG	GGTTCAAGGATTCATCGTTG	9	NP
CMTCN8	TGTA AACGACGGCCAGTCCTCCGCCACATATTACAAT	TTCATCTTGACACGTAAGAG	9	NP
CMAGN73	TGTA AACGACGGCCAGTATCCA ACTCGACCAAGAAAC	CAGCTCTACAACAACATCTC	10	P
CMAGN79	TGTA AACGACGGCCAGTCTTCACTAAA ACTACAAGAG	TTCCA ACTTATTCATCCCAC	10	NP
CMTCN6	TGTA AACGACGGCCAGTGCATTGCTCGATCAGTTTTAC	ACTCCGTCAAGATCCCAAAA	10	NP
CMAGN32	TGTA AACGACGGCCAGTCAGATTAGAAGAAAAAGAGG	AGCAGACAGCATATAAAGCT	11	NP
CMGAN24	TGTA AACGACGGCCAGTTAACTATGATGAAGAGTT	TGCCAAACTATAATCACACTA	11	NP
CMGAN80	TGTA AACGACGGCCAGTATATTGATTGCTGGGAAAGG	CTTTTTTGGCTTTATTGGGTC	11	P
CMTCN14	TGTA AACGACGGCCAGTTATATTGGCTTTGGCTCTCG	GATTCGTTATCTCGACCAAC	11	P
TJ29	TGTA AACGACGGCCAGTAGCCTAAGCCACCGATTTTT	TTCCCAAGTGGGGTTATGAG	11	P
CMCTN38	TGTA AACGACGGCCAGTTAAAACACTCTCGTGACTCC	GATCTGAGGTTGAAGCAAAG	12	NP
CMGAN94	TGTA AACGACGGCCAGTGAGAGAGAGAGAGATCTAAAC	GTCATGTCCGTTATCTTGT	12	NP
CMTCN18	TGTA AACGACGGCCAGTACCAATCCATCACTCTCACT	GAAAGAATGGGGGAAAAGAG	12	NA
CMTCN41	TGTA AACGACGGCCAGTCCCAAGATTCGTATTAATC	TGGTAGTAGAGATGATATAC	12	NA
CMTCN50	TGTA AACGACGGCCAGTTCTACTTCCATGAATCCATC	TAGAATGGTTAGGAAACCCT	12	P

AFLP analizleri için kavun'da çalıştığı daha önceki çalışmalarda gösterilen 10 primer kombinasyonu kullanılmıştır (Garcia-Mas ve ark. 2000). AFLP analizleri için kavun'da çalıştığı daha önceki çalışmalarda belirtilen ve projede kullanılan primer kombinasyonları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Table 2. AFLP primer kombinasyonları

EcoRI primerleri	MseI primerleri
E AAC	M CTC
E AAG	M CTC
E ACA	M CTC
E ACG	M CTA
E ACC	M CTA
E ACT	M CTA
E AAG	M CAT
E ACA	M CAT
E AAC	M CAC
E AAG	M CAC

AFLP analizinde ilk adım genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesidir. Bunun için, 5 µl DNA (~250 ng), 5 µl 5x reaksiyon tampon çözeltisi, 2 µl *EcoR I*/*Mse I* ve 13 µl steril dH<sub>2</sub>O içeren karışım 1.5 µl mikrosantrifüj tüpü içerisine konmuş, karıştırılmış ve 2 saat süreyle 37°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra, restriksiyon endonuklease aktivitesini inaktif hale getirmek için, bu karışım 15 dakika süreyle 70°C'de tutulmuştur. İkinci aşamada, 24 µl adaptör bağlama solüsyonu ve 1 µl T4 DNA ligase enzimi DNA karışımına eklenmiş ve iki saat süreyle 20°C'de inkübe edilmiştir. Bağlama karışımı 1:10 oranında TE tampon çözeltisi (10 µl mixture + 90 µl TE tampon çözeltisi) ile dilüsyon edilmiştir. Üçüncü aşama ön amplifikasyon reaksiyonunun hazırlanması aşamasıdır. Bu aşamada, 40 µl ön amplifikasyon primer karışımı, ön aşamada hazırlanmış olan 5 µl dilüsyon edilmiş kalıp DNA, 5 µl 10x PCR tampon çözeltisi + Mg ve 1 µl *Taq* DNA polymerase enzimi içeren karışım 0.5 ml. mikrosantrifüj tübü içerisine eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Santrifügasyondan sonra, karışım müteakip profil (94°C/30 saniye, 56°C/1 dakika, 72°C/1 dakika ve 20 döngü; 4°C'de tutulur) kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Bu PCR reaksiyonundan 3 µl ürün alınmış ve 147 µl TE tampon çözeltisi içerisinde dilüsyon edilmiştir. Son aşama seçici AFLP amplifikasyonu aşamasıdır. Bu aşamada, iki reaksiyon karıştırılmıştır. İlk karışım (karışım 1) 2.5 µl işaretlenmiş *EcoRI* primeri, 1.5 µl *MseI* primeri (dNTP içerir) ve 1 µl steril dH<sub>2</sub>O içermiştir. İkinci karışım (karışım 2) 2 µl 10x PCR tampon çözeltisi + Mg, 0.1 µl *Taq* DNA polymerase enzimi ve 79 µl steril dH<sub>2</sub>O içermiştir. PCR reaksiyonunu başlatmak için, üçüncü aşamadan elde edilen 5 µl dilüsyon edilmiş PCR ürünü, 5 µl karışım 1 ve 10 µl karışım 2 bir PCR tüpü içerisine konulmuş ve müteakip touchdown profili kullanılarak çoğaltılmıştır (94°C/30 saniye, 65°C/30 saniye, 72°C/60 saniye; sonra 12 döngü PCR yapılmıştır. Bu işlem için her bir döngüde bağlanma sıcaklığı 0.7°C düşürülmüştür, son olarak, 94°C/30 saniye, 56°C/30 saniye, 72°C/1 dakika profili olan 23 döngülük bir PCR daha yapılmıştır. Bütün bu PCR'lar sonrası, iki dilüsyon daha yapılmıştır. İlk dilüsyon; 1:3 PCR ürünü/dH<sub>2</sub>O (7 µl PCR + 14 µl dH<sub>2</sub>O) dilüsyonudur. İkinci dilüsyon; 27 µl örnek yükleme solüsyonu (SLS), 0.5 µl işaretleyici standartı 600



bp ve ilk dilüsyondan 3 µl kullanarak 1:10 hazırlanan dilüsyondur. Hazırlanan örnekler dizi analizi cihazı kabına yüklenmiş ve bir damla mineral yağ ile kaplanmıştır. Daha sonra, örneklerin yüklendiği kap Beckman-Coulter Genetic Analysis System CEQ<sup>TM</sup>8800 içerisine yerleştirilmiştir. Frag-4 metodu AFLP analizleri (ayırışma 90 °C, 120 saniye; capillary 50 °C; injeksiyon 2.0 kV, 30 saniye; ayırışma 4.8 kV, 60 dakika) için kullanılmıştır. Bu aşamadan sonra, sonuçlar istenmeyen veya düşük kalite örnekleri çıkarmak için filtrelenmiştir. Elde edilen veriler var yada yok şeklinde skorlanmıştır. Her bir SSR ve AFLP işaretleyicisi için, parçacıklar MATSUOKA ve ark. (2002) tarafından tanımlanan metod kullanarak farklı allel'leri temsil eden bin'lere bölünmüştür. Her bir işaretleyici için polimorfizm bilgi içeriği (PIC- Polymorphism information content) değeri her bir SSR için SAAL ve WRICKE (1999) tarafından tanımlanan formüle göre hesaplanmıştır:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

$p_i$   $i$ 'inci allel'in sıklığını (*frequency*) ve  $k$  ise her lokus için farklı allel'lerin toplam sayısını vermektedir.

Her bir kavun tohum örneklerini ayırma yeteneğinde olan 50 SSR ve 10 AFLP işaretleyicisi germplazm belirlenmesinde standart olarak seçilmiştir. Her bir tohum örnekleri için geliştirilen AFLP ve SSR markörlerinin genotipik değerleri ETAE Ulusal Gen Bankası Veri Tabanı Sistemi içerisine eklenmiştir. Ayrıca Enstitü germplazm koleksiyonlarındaki kavun tohum örnekleri için genetik çeşitliliği tayin etmede moleküler varyans analiz yöntemi kullanılmıştır (AMOVA; EXCOFFIER ve ark. 1992). Bütün genotiplerin özgün bir lokus için mikrosatellite değerleri: var (present) için 1, yok (absent) için 0 ve heterozigot bireyler içinde 0.5 gibi değerlerle skorlanmıştır. Bu veriler Nei'nin genetik benzerlik indeksinin (The Nei index of genetic similarity) hesaplanmasında kullanılmıştır (NEI ve LI 1979). Elde edilen bu değerler the NTSYS computer programı (ROHLF 1998) ile yapılan aritmetik ortalama kullanılarak yapılan ölçülmemiş çift grup yöntemi (UPGMA - unweighted pair-group methodu) uygulanarak kavun tohum örnekleri arasındaki genetik ilişkiyi gösteren bir dendrogram oluşturulmasında kullanılmıştır.

## 4. Bulgular ve Tartışma

### 4.1. Morfolojik Karakterizasyon Sonuçları

Çalışmada kullanılmak üzere 250 civarında kavun (*Cucumis melo*) genotipi Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü (ETAE; Menemen, İzmir) Türk Ulusal Genbankası koleksiyonundan temin edilmiştir (Tablo 3). Çalışmada kullanılan genotipler mümkün olduğunca Türkiye'nin tüm bölgelerini temsil edecek şekilde düzenlenmiştir. Ancak, çalışma materyalinin önemli bir kısmı üç ilimizden (sırasıyla; 28 adet Balıkesir, 29 adet Manisa ve 30 adet hat İzmir) toplanmıştır. Bu *Cucumis melo* genotiplerine ilave olarak, bazı *C. melo* ve diğer yakın akraba türlerini de içeren 15 genotipte; Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü'nden Prof. Dr. Nebahat Sarı tarafından sağlanmıştır. Bu hatlar, genetik analizler için tür dışı kontrol gruplarını temsil etmesi için çalışmaya dahil edilmiştir (Tablo 4).

Tablo 3. Önerilen araştırma için ETAE'den toplanan *Cucumis melo* genotipleri. Pedigri numaraları, kaynaklar ve merkezler listelenmiştir.

Kavun Genotipleri	Kaynak	Pedigri Numarası	Merkez	Ekilen miktar
TR22096	ETAE	06T1052	Adana	15
TR35299	ETAE	06T1053	Adana	15
TR62468	ETAE	06T1054	Adana	15
TR62458	ETAE	06T1055	Adıyaman	15
TR62421	ETAE	06T1056	Adıyaman	15
TR62582	ETAE	06T1057	Afyon	15
TR62577	ETAE	06T1058	Aksaray	15
TR62522	ETAE	06T1059	Amasya	15
TR62549	ETAE	06T1060	Ankara	15
TR62547	ETAE	06T1061	Ankara	15
TR61812	ETAE	06T1062	Ankara	15
TR61659	ETAE	06T1063	Ankara	15
TR61714	ETAE	06T1064	Ankara	15
TR61851	ETAE	06T1065	Ankara	15
TR62023	ETAE	06T1066	Ankara	15
TR62060	ETAE	06T1067	Ankara	15
TR62064	ETAE	06T1068	Ankara	15
TR62474	ETAE	06T1069	Ankara	15
TR66755	ETAE	06T1070	Ankara	15
TR68913	ETAE	06T1071	Ankara	15
TR57782	ETAE	06T1072	Ankara	15
TR57783	ETAE	06T1073	Ankara	15
TR61566	ETAE	06T1074	Ankara	15
TR61567	ETAE	06T1075	Ankara	15
TR61573	ETAE	06T1076	Ankara	15
TR61626	ETAE	06T1077	Ankara	15
TR61627	ETAE	06T1078	Antalya	15
TR62521	ETAE	06T1079	Antalya	15
TR62512	ETAE	06T1080	Antalya	15
TR62511	ETAE	06T1081	Antalya	15
TR62651	ETAE	06T1082	Antalya	15

TR62652	ETAE	06T1083	Artvin	15
TR62672	ETAE	06T1084	Aydın	15
TR62655	ETAE	06T1085	Aydın	15
TR62506	ETAE	06T1086	Aydın	15
TR62505	ETAE	06T1087	Aydın	15
TR61999	ETAE	06T1088	Aydın	15
TR62469	ETAE	06T1089	Aydın	15
TR57781	ETAE	06T1090	Aydın	15
TR62000	ETAE	06T1091	Aydın	15
TR62038	ETAE	06T1092	Aydın	15
TR62024	ETAE	06T1093	Aydın	15
TR62614	ETAE	06T1094	Aydın	15
TR62036	ETAE	06T1095	Aydın	15
TR62554	ETAE	06T1096	Balıkesir	15
TR61583	ETAE	06T1097	Balıkesir	15
TR62596	ETAE	06T1098	Balıkesir	15
TR62550	ETAE	06T1099	Balıkesir	15
TR62627	ETAE	06T1100	Balıkesir	15
TR62634	ETAE	06T1101	Balıkesir	15
TR61977	ETAE	06T1102	Balıkesir	15
TR61676	ETAE	06T1103	Balıkesir	15
TR62742	ETAE	06T1104	Balıkesir	15
TR61902	ETAE	06T1105	Balıkesir	15
TR62703	ETAE	06T1106	Balıkesir	15
TR62716	ETAE	06T1107	Balıkesir	15
TR62364	ETAE	06T1108	Balıkesir	15
TR62682	ETAE	06T1109	Balıkesir	15
TR62618	ETAE	06T1110	Balıkesir	15
TR62372	ETAE	06T1111	Balıkesir	15
TR37394	ETAE	06T1112	Balıkesir	15
TR40379	ETAE	06T1113	Balıkesir	15
TR43024	ETAE	06T1114	Balıkesir	15
TR61844	ETAE	06T1115	Balıkesir	15
TR61811	ETAE	06T1116	Balıkesir	15
TR61613	ETAE	06T1117	Balıkesir	15
TR61595	ETAE	06T1118	Balıkesir	15
TR61601	ETAE	06T1119	Balıkesir	15
TR61578	ETAE	06T1120	Balıkesir	15
TR61582	ETAE	06T1121	Balıkesir	15
TR43041	ETAE	06T1122	Balıkesir	15
TR43135	ETAE	06T1123	Balıkesir	15
TR43263	ETAE	06T1124	Bilecik	15
TR43265	ETAE	06T1125	Bilecik	15
TR43746	ETAE	06T1126	Bilecik	15
TR43835	ETAE	06T1127	Bilecik	15
TR46503	ETAE	06T1128	Bilecik	15
TR47811	ETAE	06T1129	Bilecik	15
TR47822	ETAE	06T1130	Bilecik	15
TR48541	ETAE	06T1131	Burdur	15

TR48611	ETAE	06T1132	Burdur	15
TR48650	ETAE	06T1133	Bursa	15
TR71500	ETAE	06T1134	Bursa	15
TR71540	ETAE	06T1135	Bursa	15
TR71541	ETAE	06T1136	Bursa	15
TR71568	ETAE	06T1137	Bursa	15
TR71571	ETAE	06T1138	Bursa	15
TR71616	ETAE	06T1139	Bursa	15
TR64142	ETAE	06T1140	Bursa	15
TR64154	ETAE	06T1141	Bursa	15
TR69895	ETAE	06T1142	Bursa	15
TR57778	ETAE	06T1143	Bursa	15
TR57780	ETAE	06T1144	Bursa	15
TR68934	ETAE	06T1145	Çanakkale	15
TR68940	ETAE	06T1146	Çanakkale	15
TR69022	ETAE	06T1147	Çanakkale	15
TR69425	ETAE	06T1148	Çanakkale	15
TR69428	ETAE	06T1149	Çanakkale	15
TR69442	ETAE	06T1150	Çanakkale	15
TR69689	ETAE	06T1151	Çanakkale	15
TR70691	ETAE	06T1152	Çanakkale	15
TR70692	ETAE	06T1153	Çanakkale	15
TR64044	ETAE	06T1154	Çanakkale	15
TR70693	ETAE	06T1155	Çanakkale	15
TR70694	ETAE	06T1156	Çanakkale	15
TR69873	ETAE	06T1157	Çanakkale	15
TR61935	ETAE	06T1158	Çanakkale	15
TR61976	ETAE	06T1159	Çanakkale	15
TR62718	ETAE	06T1160	Çanakkale	15
TR62045	ETAE	06T1161	Çanakkale	15
TR70690	ETAE	06T1162	Çanakkale	15
TR70689	ETAE	06T1163	Çanakkale	15
TR70684	ETAE	06T1164	Çanakkale	15
TR61932	ETAE	06T1165	Çanakkale	15
TR61933	ETAE	06T1166	Çanakkale	15
TR61934	ETAE	06T1167	Çanakkale	15
TR62079	ETAE	06T1168	Çorum	15
TR62098	ETAE	06T1169	Çorum	15
TR62107	ETAE	06T1170	Çorum	15
TR62053	ETAE	06T1171	Denizli	15
TR73771	ETAE	06T1172	Denizli	15
TR73800	ETAE	06T1173	Denizli	15
TR73838	ETAE	06T1174	Denizli	15
TR70686	ETAE	06T1175	Denizli	15
TR70688	ETAE	06T1176	Denizli	15
TR70695	ETAE	06T1177	Denizli	15
TR49583	ETAE	06T1178	Denizli	15
TR20920	ETAE	06T1179	Denizli	15
TR70696	ETAE	06T1180	Denizli	15

TR70697	ETAE	06T1181	Denizli	15
TR70698	ETAE	06T1182	Denizli	15
TR70699	ETAE	06T1183	Denizli	15
TR72405	ETAE	06T1184	Denizli	15
TR72406	ETAE	06T1185	Denizli	15
TR72561	ETAE	06T1186	Denizli	15
TR72562	ETAE	06T1187	Denizli	15
TR72564	ETAE	06T1188	Diyarbakır	15
TR72611	ETAE	06T1189	Diyarbakır	15
TR72619	ETAE	06T1190	Edirne	15
TR62074	ETAE	06T1191	Edirne	15
TR61691	ETAE	06T1192	Edirne	15
TR61696	ETAE	06T1193	Edirne	15
TR72654	ETAE	06T1194	Edirne	15
TR70687	ETAE	06T1195	Edirne	15
TR72669	ETAE	06T1196	Edirne	15
TR72670	ETAE	06T1197	Edirne	15
TR72705	ETAE	06T1198	Edirne	15
TR73444	ETAE	06T1199	Edirne	15
TR73693	ETAE	06T1200	Edirne	15
TR73696	ETAE	06T1201	Edirne	15
TR73740	ETAE	06T1202	Erzincan	15
TR61543	ETAE	06T1203	Erzincan	15
TR61866	ETAE	06T1204	Erzincan	15
TR61903	ETAE	06T1205	Erzincan	15
TR61968	ETAE	06T1206	Erzurum	15
TR61732	ETAE	06T1207	Eskişehir	15
TR61750	ETAE	06T1208	Eskişehir	15
TR62610	ETAE	06T1209	Eskişehir	15
TR62434	ETAE	06T1210	Eskişehir	15
TR70682	ETAE	06T1211	Eskişehir	15
TR70683	ETAE	06T1212	Eskişehir	15
TR63230	ETAE	06T1213	Eskişehir	15
TR66366	ETAE	06T1214	Gaziantep	15
TR66362	ETAE	06T1215	Gaziantep	15
TR62648	ETAE	06T1216	Gaziantep	15
TR62612	ETAE	06T1217	Gaziantep	15
TR70685	ETAE	06T1218	Hakkari	15
TR64163	ETAE	06T1219	Hakkari	15
TR66004	ETAE	06T1220	Hakkari	15
TR66008	ETAE	06T1221	Hatay	15
TR66005	ETAE	06T1222	Hatay	15
TR66007	ETAE	06T1223	Hatay	15
TR66003	ETAE	06T1224	Hatay	15
TR66002	ETAE	06T1225	Hatay	15

Tablo 4. Önerilen projede analiz edilecek Cucumis ve yakın akraba türler

<b>Tür</b>	<b>Hat</b>
<i>Cucumis melo</i>	Kavun (Kav-64)
<i>Cucumis melo</i>	Kavun (Kav-66)
<i>Cucumis melo</i> var. <i>flexuosus</i>	Acur (Acur 16)
<i>Cucumis melo</i> var. <i>flexuosus</i>	Acur (Acur 44)
<i>Cucumis melo</i> var. <i>flexuosus</i>	Acur (Acur 54)
<i>Cucurbita pepo</i>	Sakız kabağı
<i>Cucurbita maxima</i>	Kestane, Helvacı kabagi
<i>Cucurbita maxima</i>	Kestane, Helvacı kabagi
<i>Cucurbita maxima</i>	Kestane, Helvacı kabagi
<i>Cucurbita moschata</i>	Bal kabağı
<i>Cucurbita pepo</i> convar. <i>turbaniformis</i>	-
<i>Lagenaria siceraria</i>	Su kabagi
<i>Lagenaria siceraria</i>	Su kabagi
<i>Luffa cylindrica</i>	Lif kabagi
<i>Momordica charantia</i>	Kudret narı

Birinci yıl denemeleri için 19 Şubat 2007 tarihinde tohum ekimleri yapılan yaklaşık 150 adet kavun populasyonu 28 Mart 2007 tarihinde herbir genotipi temsilen 10 adet bitki seraya dikilmiştir. Ekilen 11 populasyonda tohum çimlenmesi ve çıkışı sağlanamamıştır. Morfolojik karakterizasyonda IPGRI'nin kavun için yayınlamış olduğu kavun tanımlama listesi kullanılmıştır. Kavun populasyonlarının genel yapısını ortaya koymak amacıyla gözlemler 10 bitkide gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın yürütülmesi sırasında tanımlamada yardımcı olacağı düşüncesiyle bitki, yaprak ve meyve fotoğrafları (yaklaşık 7000 adet) çekilmiştir. Fide dönemiyle birlikte başlayan gözlemler 15 Nisan 2007 tarihinden sonra çiçeklenme, bitki, yaprak ve meyve gözlemleriyle devam etmiştir. İkinci yıl denemeleri için 100 adet kavun populasyonunda morfolojik karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaç için 14 Şubat 2008 tarihinde tohum ekimleri yapılan populasyonların çıkışları 25 Şubat 2008 tarihinde çıkışlarını tamamlamış, 19 Mart 2008 tarihinde seraya dikilmiştir. Ekilen populasyonların tümünde tohum çimlenmesi ve çıkış sağlanmıştır. Morfolojik gözlemlerin yapıldığı bu populasyonların bakım işlemleri (sulama, askıya alma, gübreleme, çapalama ve ot temizliği vb.) yapılmıştır. Morfolojik karakterizasyonda birinci yıl denemelerinde olduğu gibi IPGRI'nin kavun için yayınlamış olduğu kavun tanımlama listesi kullanılmıştır. Gözlemler yine 10 bitkide gerçekleştirilmiştir. Genetik kaynaklar materyalinde fotoğrafla tanımlama çalışmalarına alt yapı oluşturmak amacı ile çalışmanın yürütülmesi sırasında tanımlamada yardımcı olacağı düşüncesiyle bitki, yaprak ve meyve fotoğrafları çekilmiştir. Fide dönemiyle birlikte başlayan gözlemler 15 Nisan 2008 tarihinden itibaren çiçeklenme, bitki, yaprak ve meyve gözlemleriyle devam etmiştir. Bitki ve yaprak gözlemleri ile farklılığın görüldüğü populasyonlarda, meyve döneminde populasyon içinde dahi farklılıkların olduğu gözlenmiştir. Şekil 1-4 serada yetiştirilen bazı kavun genotiplerinin genel görüntülerini göstermektedir.



Şekil 1-2. Denemenin kurulduğu seralarda kavun populasyonları.



Şekil 3-4. Kavunda dişi ve erkek çiçekler – Kavunda meyvelerin gelişimi.

Proje süresince 239 kavun genotipinden elde edilen morfolojik karakterlere ait veriler birleştirilerek analiz edilmiştir. Morfolojik karakterlere ait verilerin dağılımları aşağıda seksiyonlar halinde özetlenmiştir. İncelenen karakterler için populasyonlar içerisinde varyasyon yoksa yada çokaz ise histogram dağılımları gösterilmemiştir.

#### 4.1.1. Genel Büyüme Karakterleri

Fide gücü ve bitki büyüme şekli de bakımından incelenen 239 kavun genotipinde (tohum örneğinde) çok az düzeyde yada hiç varyasyon gözlenmemiştir. Bütün kavun genotipleri güçlü fide ve çok dal oluşturmuştur. Fide gücü yönünden populasyonlar çıkıştan 20 gün sonra gözlenmiş ve bütün populasyonlarda güçlü fide gelişimi görülmüştür. Bitki büyüme şekli yönünden populasyonlar çok dallı grupta yer almıştır. Buna bağlı olarak bitki büyüklükleri de sınırsız büyüyen ve büyük bitki olarak tanımlanmıştır (Şekil 5). Bitkide dallanma sayısı çiçeklenme döneminde gözlenmiştir ve genotipler arasında önemli düzeyde varyasyon göstermiş ve bitki başına en az 4, en çok 7 olarak belirlenmiştir. Ortalama dal sayısı 3 olmuştur.



Şekil 5. Populasyonlarda gözlenen büyüme şekli.

Gövde sonu şekli çukur (1) ve sivri (4) arasında değişiklik göstermiş olup incelenen genotiplerin %50'ye yakını sivri gövde sonu şekline sahip olmuştur. Olgunlaşma zamanı orta (70-90 gün arası) ve çok geç (>110 gün) olarak gözlenmiştir. İncelenen genotiplerin hiç biri erkenci grup içerisinde yer almamıştır.

#### 4.1.2. Yaprak Karakterleri

Yaprak şekli bütün (1) ve 5 loblu (3) grupta yer almış ve incelenen genotiplerin yaklaşık yarısı 5 loblu yapraklara sahip olmuştur. Yaprak lobluluğunda ise genotiplerin yarısında yüzeysel (3) ve diğer yarısında ise orta (5) lobluluk gözlenmiştir (Şekil 6). İlaveten, bir kaç genotipin derin loblu (7) yapraklara sahip olduğu belirlenmiştir. Ortadaki yaprak lobunun şeklinde her grupta dağılım görülmüştür, genellikle geniş oval (1) yada elips (4) şeklinde olan yapraklar daha ağırlıklı görülmüştür. Ancak çok az sayıda örnekte yüzeysel dikdörtgen (2) şekilli yapraklar gözlenmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. Populasyonlarda yaprak şekli ve lobluluğu.

Yaprak rengi bakımından populasyonlarda açık yeşil (1), yeşil (2) ve koyu yeşil (3) renkler gözlenmiştir çoğunlukla genotipler yeşil yaprak renkli olmuştur (Şekil.7). Yaprak dayanıklılığı bakımından kavun genotipleri düşük (3) ve yüksek (7) olmak üzere farklılık göstermiştir. İncelenen kavun genotiplerinin büyük bir kısmı yaprak dayanıklılığı bakımından düşük (3) yada orta (5) düzeyde çok az sayıda genotip ise yüksek dayanıklı bulunmuştur. Benzer şekilde, çok az sayıda kavun genotipi %80 meyve olgunlaşması döneminde hafif yaprak yaşlanması (3) göstermiştir. Genotiplerin büyük bir kısmı orta (5) ve tam yaprak yaşlanması (7) göstermiştir. Yaprak sap tüylülüğü bakımından kavun genotipleri genelde düşük düzeyde varyasyon göstermiştir, genotiplerin çoğunun sapları tüylü bulunmuştur. Ancak çok az sayıda genotipte yüksek düzeyde seyrek yaprak sap tüylülüğü (1) gözlenmiştir.





Şekil 7. Populasyonlarda yaprak rengi.

#### 4.1.3. Çiçek Karakterleri

Kavun populasyonlarında çiçek tipi bakımından çok az düzeyde varyasyon belirlenmiştir, genelde monoik ve andromonoik çiçek tipi gözlenmiştir (Şekil 8). İncelenen kavun genotiplerinin çoğu andromonoik (erkek/dişi ve erkek) çiçek tipine sahip olurken sadece birkaç genotipte monoik (erkek ve dişi) çiçek tipi gözlenmiştir. Çiçek rengi bakımından populasyonlar arasında farklılık görülmemiştir, çoğu genotipler sarı çiçekli olmuştur ve sadece 1 genotip koyu sarı renkli çiçek oluşturmuştur.



Şekil 8. Populasyonlarda çiçek yapıları.

Çiçek burnu şekli bakımından kavun genotipleri çukur (1) ve sivri (4) arasında değişiklik göstermiştir, çoğu genotipler düz çiçek burnu şekline sahip olmuştur. Ovaryum tüy uzunluğu ve tüylenme tipi bakımından kavun genotipleri arasında çokaz düzeyde varyasyon belirlenmiştir, genotiplerin çoğu kısa (< 1 cm) ve yaygın tüylü bulunmuştur. %50 çiçeklenme gün sayısı bakımından populasyonlar 20 ile 48 gün arasında yer almışlardır.

#### 4.1.4. Meyve Karakterleri

Yerel çeşitlere ait kavun tohum örneklerinin çoğunun populasyon yapısında olmalarından dolayı meyve morfolojik özellikleri yönünden populasyonlar arasında oldukça geniş bir varyasyon olduğu gözlenmiştir (Şekil 9).



Şekil 9. Kavun populasyonlarda değişik meyve şekli ve rengi.

Bu durumun tersine olarak, bazı kavun örneklerinin tek bitkilerinden alınan meyve örneklerinin şekil, renk ve boyut bakımından oldukça homojen bir durum göstermiştir (Şekil 10). Bu durum yerel çeşidin belirgin bir şekilde homojenliğe sahip olduğunu işaret etmektedir.



Şekil 10. 166 numaralı örneğin farklı bitkilerinden alınan homojen meyve morfolojisi.

Kavun genotiplerinin meyve ağırlıkları 100 g (1) ile 4500 g (9) arasında değişiklik göstermiştir, ortalama meyve ağırlıkları 1400 – 1800 gr arasında bulunmuştur (Şekil 9). Kavun genotipleri meyve şekilleri bakımından da düz (2) den uzuna (8) kadar büyük şekil farklılıkları göstermiştir, çoğu örnekler düz (2) yada eliptik (4) şekilli meyveler oluştururken çokaz sayıda genotip palamut (7) yada uzun meyve oluşturmuştur (Şekil 9). Meyve boyu bakımından kavun genotipleri 5 ile 30 cm arasında değişiklik göstermiş olup ortalama meyve boyu 17.1 cm. olarak bulunmuştur. Çoğu kavun genotipleri meyve boyu bakımından uzunla kısa arasında değerler vermiştir ve normal dağılım göstermiştir. Benzer şekilde meyve eni de normal dağılım göstermiş olup meyve eni bakımından kavun genotipleri 7 ile 20 cm arasında değişiklik göstermiştir, ortalama meyve eni 14.2 cm. olarak bulunmuştur. Meyve uzunluk / genişlik oranı da <1 (uzundan ziyade geniş meyve) ve 2 (genişten ziyade uzun meyve) arasında farklılık göstermiştir. Ancak, en büyük kategoriye meyve uzunluk / genişlik oranı 1 olan yuvarlak meyvelere sahip genotipler oluşturmuştur (Şekil 9). Meyve zemin rengi bakımından da kavun genotipleri sarı ve turuncu arasında farklılık göstermiştir, en büyük kategoriye açık sarı renkli (2) genotipler oluşturmuştur. Bu grubu açık yeşil ve turuncu renki (8) meyvelere sahip olan genotipler izlemiştir (Şekil 9). İkinci meyve rengi açık sarı'dan (2) gri'ye (10) kadar değişiklik göstermiştir. Koyu ve siyah yeşil renk en genel olarak gözlenen ikinci meyve rengi olmuştur. Bu meyve rengine sahip genotipleri krem, kahverengi ve gri renkli ikinci meyve rengine sahip genotipler izlemiştir. Çokaz sayıda örnekte ikinci meyve kabuk deseni hiç bulunmazken geri kalan kavun genotipleri benekli (1) yada uzun çizgili (5) meyvelere sahip olmuştur (Şekil 9). En genel meyve kabuk deseni benekli ve noktali olarak belirlenmiştir, çokaz sayıda genotipte çizgili desen (4, 5) gözlenmiştir (Şekil 9). Meyve yüzeyi damarlı (1) ve dikişli (10) arasında değişiklik göstermiştir. Kavun genotiplerinin hiç birisi düz yüzeye sahip olurken en genel meyve yüzeyi damarlı (1), kırışık (3), dalgalı (5) ve çok ağılı (9) olarak gözlenmiştir (Şekil 9). Meyve tadı bakımından kavun genotipleri tatsız (3) ve tatlı (7) arasında farklılık göstermiştir, incelenen genotiplerin büyük bir kısmı orta düzeyde tatlı olmuştur. Olgun meyve acılığı bakımından genotipleri hiç birisi acı olmadığı için farklılık göstermemiştir. Meyve eti rengi bakımından kavun popülasyonları arasında beyaz renkten (1) turuncuya (7) kadar geniş bir dağılım görülmüştür, incelenen genotiplerin büyük bir kısmı krem (3) ve açık yeşil (4) renkli meyve etine sahip olmuştur. Çokaz sayıda genotip sarı ve yeşil renkli meyve etine sahip olduğu bulunmuştur (Şekil 10). Meyve eti kalınlıkları en az 5 mm, en çok 50 mm olarak ölçülmüştür. İlginç bir şekilde bu karakter bakımından kavun örnekleri iki gruba ayrılmıştır: çok ince (5 mm veya daha az) meyve eti olan genotipler ve ortalama meyve eti kalınlığından daha yüksek (>16.8 mm) meyve eti kalınlığına sahip olan genotipler. Meyve eti yapısı bakımından da kavun genotipleri düz sıkı (1) ve lifli kuru (6) arasında olmak üzere farklılık göstermiştir, incelenen çok az sayıda kavun genotipi kumlu sıkı (2), kuru (4) veya lifli kuru (6) meyve eti yapısına sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 11).





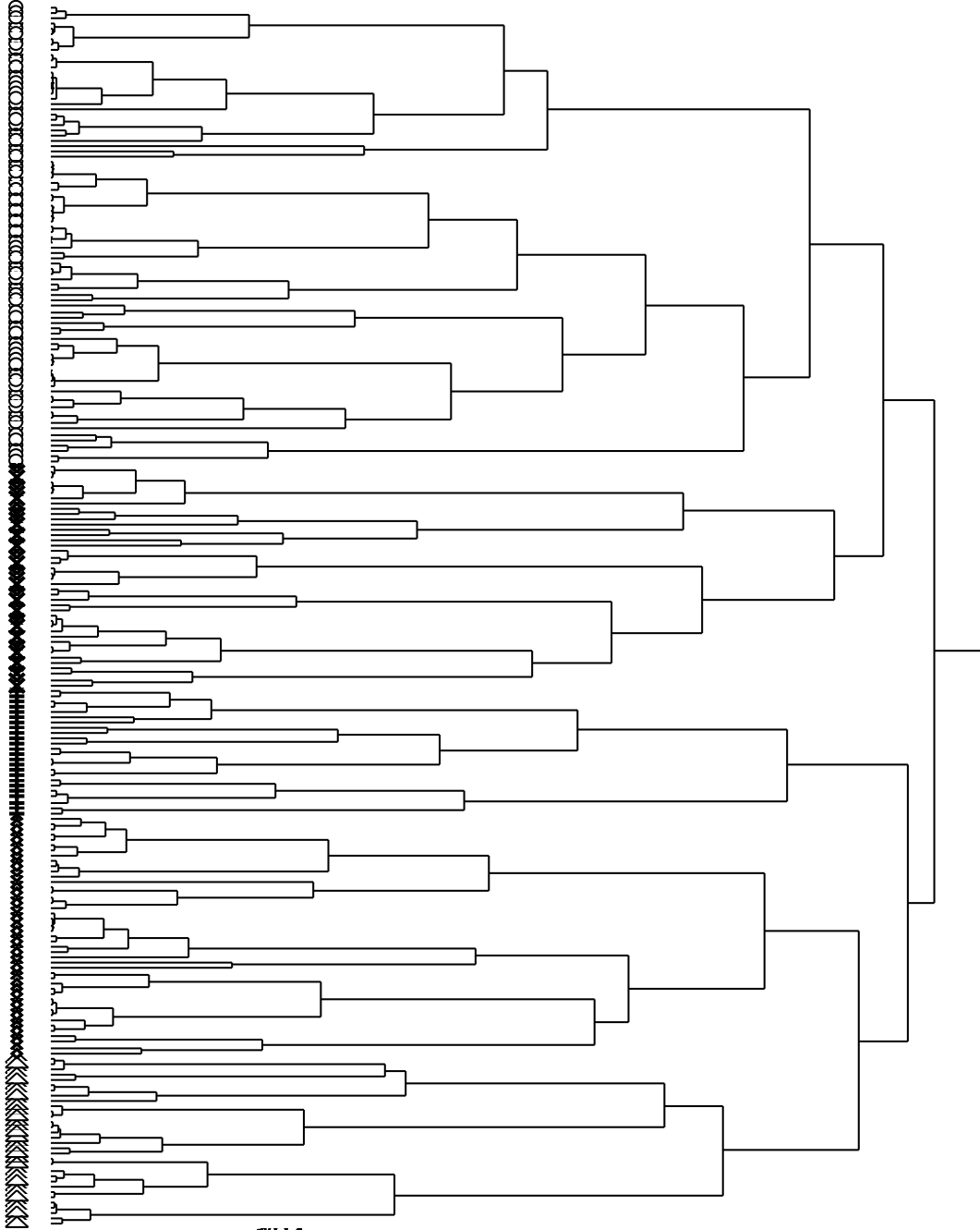
Şekil 10. Populasyonlarda meyve eti renkleri.

#### 4.1.5. Tohum Karakterleri

Tohum büyüklüğü bakımından kavun genotipleri çok küçük (1, <5 mm) ve geniş (4, 13-16 mm) arasında olmak üzere farklılık göstermiştir, incelenen kavun örneklerinin büyük bir çoğunluğu iri tohumlara sahip oldukları bulunmuştur. Tohum şekli bakımından da kavun genotipleri yuvarlak (1) ve oval (3) arasında olmak üzere farklılık göstermiştir, incelenen kavun örneklerinin büyük bir çoğunluğu eliptik veya oval şekilli tohumlara sahip olmuşlardır. Ayrıca, incelenen kavun genotiplerinin 100 tohum ağırlıklarında 2 gr. veya yaklaşık 6 gr. arasında değişiklik göstermiştir. Tohum ağırlığı normal dağılım göstermiş olup genotiplerin büyük bir kısmının ortalama tohum ağırlığı yaklaşık 4 gr.civarında olmuştur.

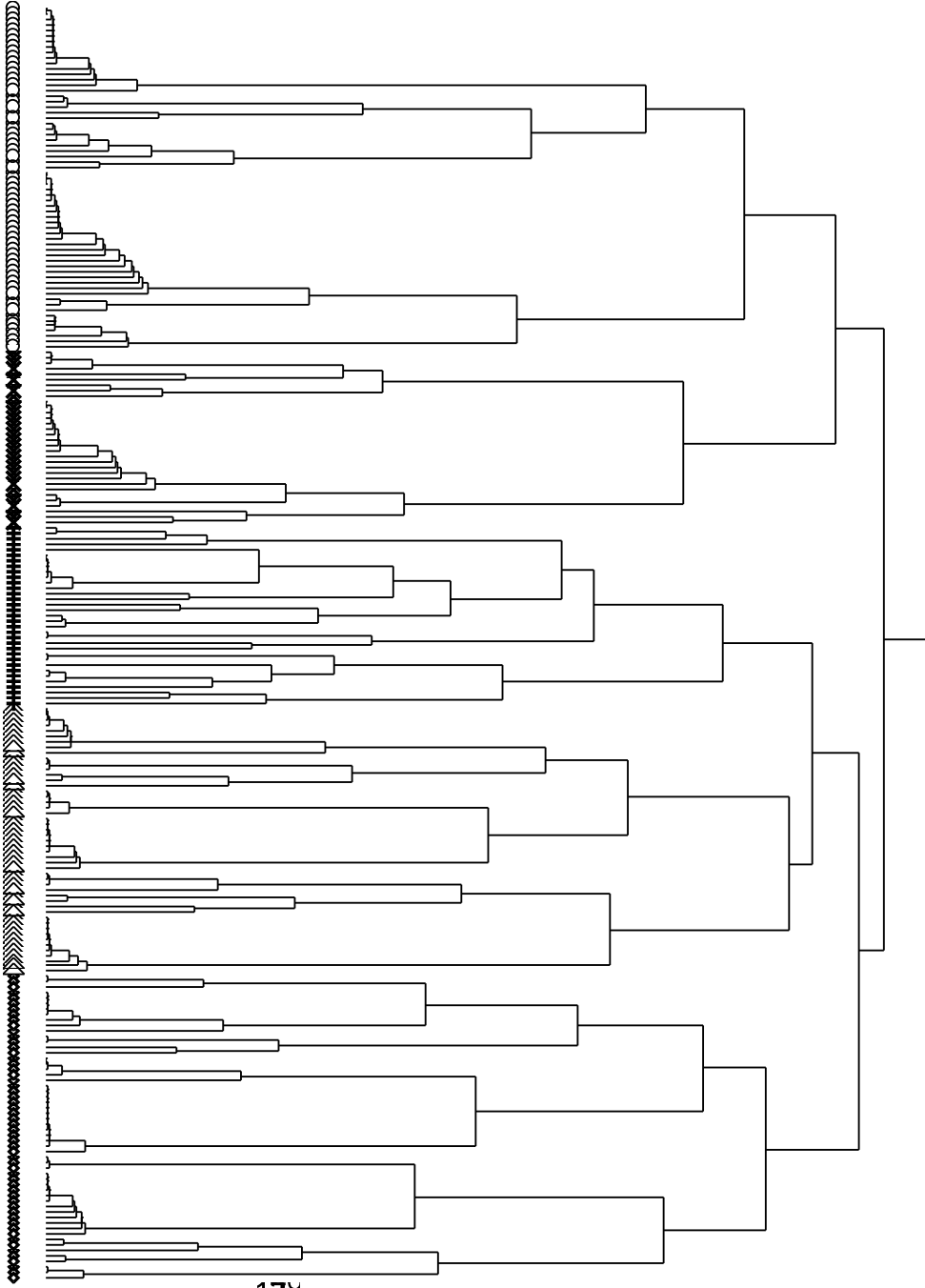
#### 4.1.6. Morfolojik Karakter Gruplama (Cluster) Analizleri

Gruplama (Cluster) analizleri genotipler arasında varyasyon gösteren bazı morfolojik karakterler için JMP bilgisayar programında bulunan Ward metodu kullanılarak uygulanmıştır. İlk analizde, kullanılan karakterler arasında olgunlaşma zamanı, meyve şekli, meyve zemin rengi, ikinci meyve rengi, kabuk deseni, meyve ağırlığı, et kalınlığı, et rengi ve et tadı birlikte yer almaktadır. Analizler kavun genotiplerinin incelenen karakterlere göre 5 grup içerisine düştüğünü göstermiştir (Şekil 12).



Şekil 12. Kavun genotiplerinin seçilmiş bazı morfolojik karakterler ile yapılan cluster analizleri. Gruplar içerisinde yer alan bazı örnekler seçilmiştir. 8 karakterler için yüksek düzeyde benzerlik göstermiştir.

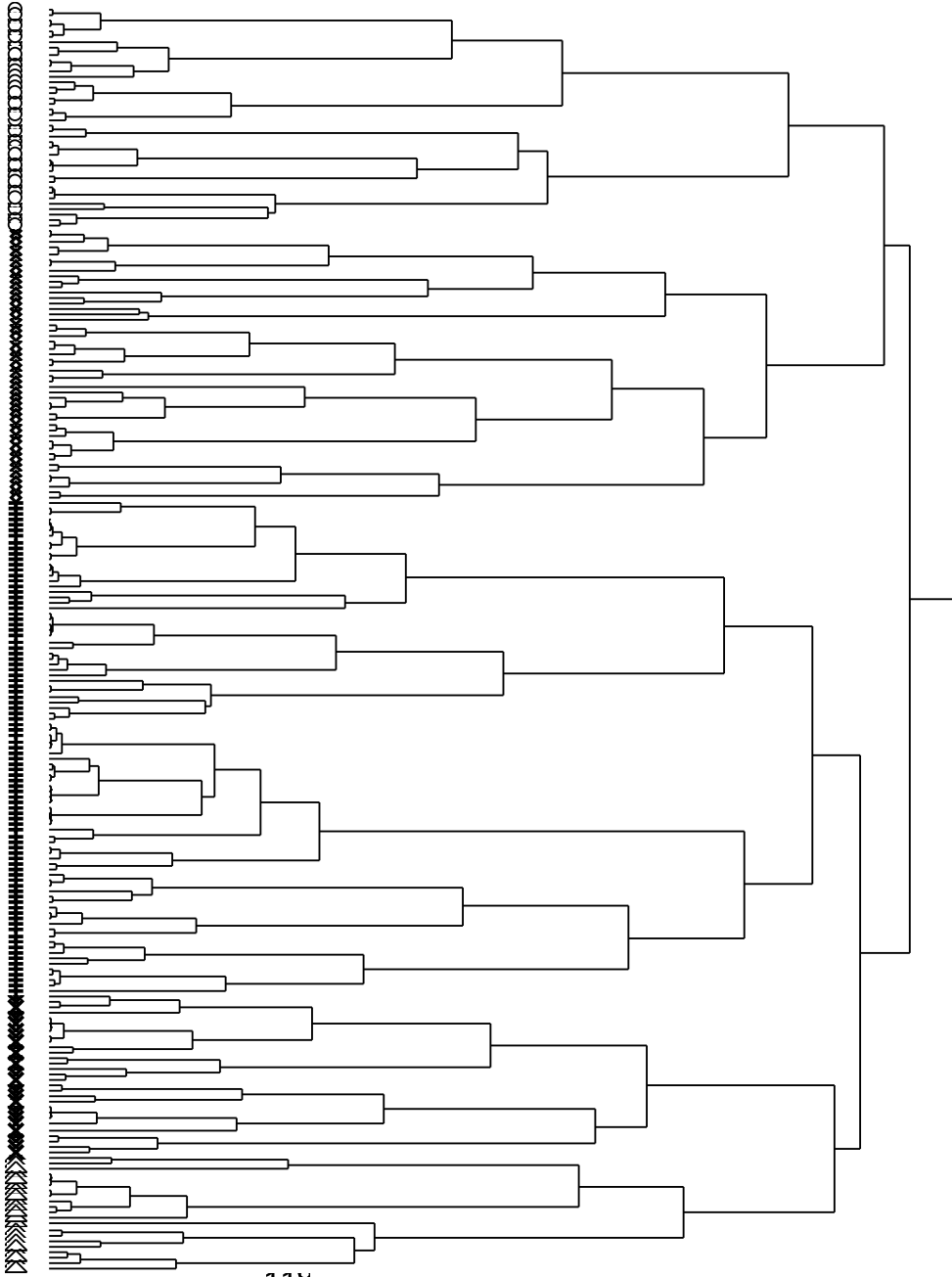
Gruplama kavun örneklerinin jeoğrafik orijinleri ile ilişkili bulunmamıştır. Farklı bir grup karakterin seçimi kavun popülasyonlarının yapılarını farklı karakterlere bağlı olarak incelenmesine imkan sağlamıştır. Bu nedenle, gruplama analizi sadece yaprak karakterleri için de uygulanmıştır (Şekil 13).



Şekil 13. Kavun örneklerinin yaprak karakterleri için yapılan gruplama analizleri.

Kavun örnekleri gruplar içinde çok yüksek benzerlik oranı göstererek 5 grup içerisinde oluşmuştur. Gruplama analizi ayrıca meyve karakterleri içinde yapılmıştır (Şekil 14). Bu analizler için kavun örnekleri yaprak karakterlerine göre daha fazla varyasyon göstermiştir ve 6 grup içerisinde yer almıştır. Bu tür gruplama analizleri germplazm araştırmacıların tohum çoğaltılması amacıyla genetik olarak en farklı genotipleri belirlemesi için faydalıdır. Ayrıca, gruplama analizleri morfolojik karakterler için yapılacak ıslah çalışmalarında kullanılmak üzere

yeni allel kombinasyonlarına sahip olan çeşitlerin geliştirilmesi amacıyla en özgün örnekleri seçmesi açısından bitki  
islahçıları içinde oldukça faydalıdır.

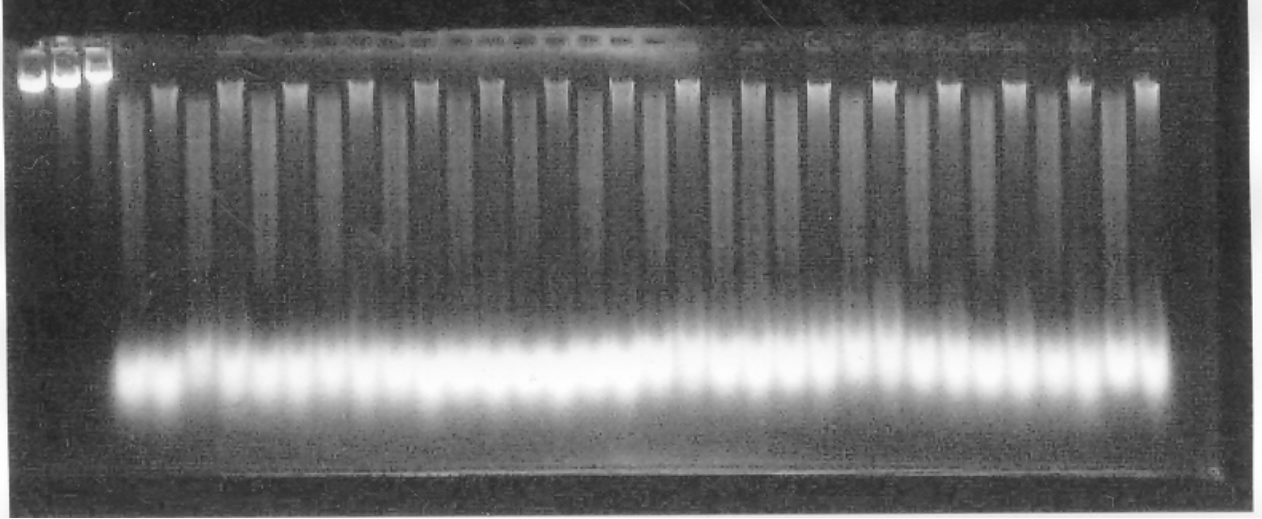


Şekil 14. Kavun genotiplerinin meyve karakterleri için yapılan gruplama analizleri

## 4.2. Moleküler Karakterizasyon Sonuçları

### 4.2.1. DNA Ekstraksiyonu

Moleküler genetik analizler için daha homojen materyal sağlamak amacı ile her örnekteki bitkiler tek tek kendilenmiştir. Tüm bireylerde (yaklaşık 1380 tek bitki) genetik analiz yapmanın imkansızlığı ve gereksizliği nedeni ile her tohum örneğini (genotipi) temsil eden bitkiler seçilmiştir. Tohum örneğinin homojen olması durumunda bu tohum örneğini temsilen tek bir bitki seçilmiş, örnek heterojen ise bitkiler morfolojilerine göre gruplanarak her gruptan bir bitki seçilmiştir. Kendilenecek ve morfolojik farklılıklarına göre gruplandırılarak seçilen genotiplerin meyveleri hasat edilerek tohumları hazırlanmış ve moleküler analizler için serada ekilmiştir. Bitkiler 1-2 gerçek yaprak vermeye başladıktan sonra DNA'ları çıkarılmaya başlanmıştır. Herbir genotipi temsilen en az 5-10 bireyden en küçük ve taze yapraklar alınmış ve tek bir eppendorf tüpüne konularak homojenize edilmiştir. DNA izolasyonu için, öncelikle FULTON ve ark. (1995) tarafından tanımlanan mikroprep metodu kullanılmıştır. Bu metodla istenilen düzeyde DNA izolasyonu yapılmayan genotipler için Promega Wizard Genomik DNA Ekstraksiyon kiti kullanılmıştır. İki genotipin tohumları çimlendirilememiş ve bu nedenle toplam 2136 bireyden DNA'lar izole edilmiştir. Sonrasında DNA'nın miktarı ve kalitesi %1'lik 1x TBE Agarose jelde 3 µl restrüksiyon enzimi ile kesimlenmiş ve kesimlenmemiş DNA'ların elektroforezi ile belirlenmiştir. Restrüksiyon enzimi ile kesimleme ürünleri, 3 µl DNA, 1.5 µl 10 x reaksiyon çözeltisi, 1.0 µl *Hind*III enzimi ve 14.5 µl su içermektedir ve bu ürünler 37°C de 3 saat süre ile inkübe edilmiştir. Bu analizler neticesinde, DNA ekstraksiyon kiti ile, eşit konsantrasyonda ve iyi nitelikte DNA elde edildiği belirlenmiştir (Şekil 15).



Şekil 15. DNA nitelik ve niceliğinin kontrol edildiği bir jel fotoğrafı örneği. 1-3 sıralar, lambda DNA standartları (sırasıyla, 50, 100 ve 250 ng) ve kalanlar ise çiftler halinde kesimlenmiş ve kesimlenmemiş kavun hatlarına ait DNA'lardır.

Ayrıca, DNA'nın miktarı ve kalitesi Nanodrop ile de belirlenmiştir. Bu işlem için her bir DNA örneği 100 µl DNA rehidrasyon tampon çözeltisi içinde yeniden suspansiyon haline getirilerek, Nanodrop ND-1000 spektrofotometre kullanılarak DNA'ların kalite ve kantitesi kontrol edilmiştir (Tablo 5). DNA konsantrasyonları 38 ile 1200 ng/µl arasında değişmiştir. Pek çok örnekte ise 100-200 ng/µl değerini almıştır. Genelde DNA kalitesi oldukça iyi düzeyde



olup, protein ve etanol kontaminasyonu ölçümleri için kullanılan A260/A280 ve A260/A230 oranları 1.8 değerinden büyük değerler almıştır (Tablo 5). Daha sonra her bir DNA örneği 50 g/μl'e seyreltilmiştir. Örnek konsantrasyonları kontrol edilmiş ve gerektiğinde yeniden seyreltilerek ayarlanmıştır. Her bir hatta ait 8 bitkiden alınan DNA örnekleri, her genotip için 20 μl'lük bir mikrofuj tüp içerisinde bir araya getirilmiştir (herbir genotip için DNA havuzu oluşturulmuştur). Böylece, 239 adet havuzlanmış DNA örneği genetik analizlerde kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

Tablo 5. Kavun örneklerinin her bir bitkisinden izole edilen DNA'nın kalite ve kantitesi. Değerler 1.8 den düşükse Abs 260/280 protein kontaminasyonu ve Abs 260/230 etanol kontaminasyonu göstermektedir.

Örnek Numarası	DNA Konsantrasyonu (ng/ul)	Abs 260/280 (nm)	Abs 260/230 (nm)	Örnek Numarası	DNA Konsantrasyonu (ng/ul)	Abs 260/280 (nm)	Abs 260/230 (nm)
TR15776-2	144.58	1.84	2.30	TR47822-6	119.43	1.82	1.92
TR15776-7	222.32	1.93	2.29	TR47825-2	183.14	1.80	1.84
TR22092-1	99.22	1.81	1.80	TR47825-5	185.14	1.81	1.93
TR22096-3	135.25	1.89	2.09	TR47825-7	190.05	1.81	1.87
TR22096-6	130.19	1.92	2.25	TR47825-8	100.75	1.78	1.81
TR26195-4	167.97	1.81	2.12	TR47825-9	235.00	1.82	1.89
TR26762-2	341.32	1.83	2.09	TR47833-5	171.90	1.81	2.09
TR31534-1	98.52	1.78	2.32	TR47833-9	206.24	1.82	1.94
TR31586-1	176.45	1.86	2.15	TR47845-2	178.28	1.81	1.96
TR31586-10	86.10	1.77	2.21	TR47845-5	81.64	1.82	1.80
TR31586-7	221.53	1.84	2.11	TR47845-7	203.72	1.84	1.96
TR31586-9	283.59	1.83	2.01	TR47846-1	212.89	1.82	1.78
TR31588-10	142.47	1.90	2.21	TR47846-4	316.19	1.82	1.85
TR31588-5	94.01	1.83	1.91	TR47861-4	195.66	1.81	2.03
TR31588-7	157.05	1.66	0.80	TR47861-7	267.83	1.86	1.76
TR31589-3	130.27	1.86	1.92	TR47867-1	343.30	1.85	2.04
TR31589-5	53.33	1.76	2.80	TR47867-4	243.40	1.82	1.99
TR31589-9	309.69	1.86	2.49	TR47867-5	236.48	1.82	2.04
TR33304-1	242.57	1.85	2.38	TR47867-7	212.10	1.81	2.10
TR33304-2	269.61	1.85	2.11	TR47874-4	213.22	1.82	1.73
TR33304-4	206.82	1.85	2.25	TR47874-6	224.25	1.82	2.26
TR33304-7	117.13	1.82	2.08	TR47874-8	144.72	1.86	1.81
TR33304-8	81.27	1.81	2.29	TR47884-6	165.44	1.78	1.82
TR33380-1	193.76	1.83	2.11	TR47884-7	163.11	1.79	1.81
TR33380-2	102.82	1.82	2.36	TR47885-2	278.47	1.82	1.94
TR35299-3	198.89	1.86	2.29	TR47885-6	158.74	1.82	1.93
TR35299-9	172.99	1.83	2.31	TR48527-2	95.13	1.73	1.85
TR37394-3	212.22	1.79	1.93	TR48527-5	91.57	1.83	2.10
TR37394-6	182.64	1.85	2.07	TR48541-1	159.06	1.78	1.85
TR38116-2	85.03	1.86	2.60	TR48541-3	129.03	1.77	1.63
TR38116-3	142.52	1.78	2.34	TR48566-5	94.04	1.83	2.20
TR38116-4	334.35	1.84	2.08	TR48567-1	129.73	1.80	2.09
TR38125-4	162.72	1.81	1.87	TR48611-3	206.16	1.97	2.13
TR38125-9	192.58	1.84	1.83	TR48650-10	109.04	1.87	2.15

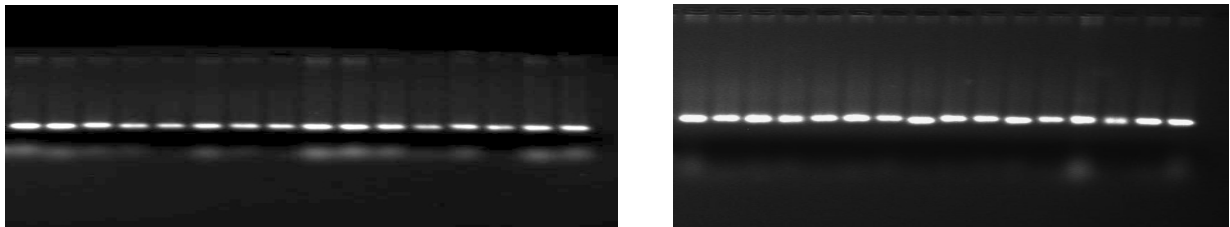
TR38224-5	171.99	1.84	2.10	TR48650-2	92.35	1.84	1.99
TR38479-1	109.85	1.92	2.35	TR48650-7	81.55	1.90	1.91
TR38479-4	105.29	1.75	2.10	TR48671-5	192.98	1.80	1.94
TR38484-2	99.30	1.79	2.02	TR48671-6	107.24	1.79	2.21
TR38484-4	137.93	1.82	1.95	TR48671-7	231.64	1.83	2.09
TR38484-7	111.22	1.80	2.10	TR48671-8	213.84	1.82	2.04
TR39655-1	138.56	1.82	2.18	TR49583-1	148.49	1.90	2.36
TR39655-3	151.94	1.82	2.47	TR49583-3	106.11	1.87	2.06
TR39655-6	143.33	1.82	2.16	TR49591-10	538.61	2.05	2.26
TR39655-7	215.26	1.81	2.05	TR49591-3	167.85	1.85	2.25
TR39683-9	94.32	1.81	2.11	TR49882-2	80.97	1.78	2.03
TR40280-1	213.71	2.00	2.39	TR50719-2	141.98	1.79	2.02
TR40284-1	82.30	1.76	1.55	TR50719-5	159.70	1.77	1.93
TR40284-6	129.89	1.77	1.80	TR50728-7	204.56	1.82	1.99
TR40284-8	217.34	1.83	2.30	TR50747-3	120.40	1.81	2.11
TR40345-10	302.56	1.85	2.09	TR50747-4	142.90	1.82	2.11
TR40345-5	162.33	1.81	1.93	TR50747-6	141.11	1.84	2.22
TR40345-7	415.96	1.93	2.30	TR50747-8	292.32	1.93	2.31
TR40350-1	104.20	1.85	2.30	TR51531-3	212.33	1.82	2.10
TR40365-2	268.12	1.85	2.06	TR51531-5	134.25	1.96	2.68
TR40365-4	207.73	1.82	2.25	TR51531-9	170.81	2.02	2.55
TR40379-7	318.64	1.82	1.93	TR51550-2	165.15	1.82	2.27
TR40380-1	297.94	1.90	2.16	TR51550-3	128.09	1.79	2.28
TR40382-10	325.06	1.85	1.90	TR51550-5	197.10	1.84	2.17
TR40382-6	139.03	1.83	2.11	TR51561-2	235.82	1.82	1.90
TR40384-4	257.44	1.84	2.12	TR51561-3	262.70	1.84	2.10
TR40384-8	145.61	1.84	2.08	TR51608-2	296.16	1.85	2.16
TR40503-3	170.39	1.85	2.14	TR51608-6	88.17	1.77	1.97
TR40503-8	187.02	1.83	2.13	TR51676-2	86.41	1.80	1.98
TR40514-3	181.08	1.81	1.84	TR51676-7	110.11	1.81	2.05
TR40530-2	139.05	1.81	2.03	TR51763-1	96.78	1.79	1.84
TR40530-8	84.93	1.77	1.90	TR51763-2	146.97	1.84	2.02
TR40534-4	229.84	1.82	1.88	TR51763-9	79.45	1.78	2.02
TR40559-4	165.13	1.79	1.66	TR57778-7	141.87	1.90	2.13
TR40559-8	185.10	1.92	2.16	TR57780-2	124.89	1.88	1.94
TR40563-2	177.62	1.81	1.81	TR57781-3	112.02	1.96	2.54
TR40563-8	142.34	1.78	1.73	TR57782-4	84.38	1.84	2.11
TR43015-6	216.81	1.85	2.12	TR57783-7	113.48	1.88	1.96
TR43015-9	126.06	1.85	2.42	TR61543-6	104.43	1.91	2.20
TR43023-4	295.22	1.86	2.24	TR61566-5	86.82	1.95	2.09
TR43023-7	238.34	1.85	2.10	TR61573-3	125.84	1.86	2.22
TR43023-8	211.36	1.86	2.22	TR61626-5	103.35	1.88	2.01
TR43024-10	189.10	1.82	2.18	TR61627-10	91.17	1.86	2.04
TR43024-7	382.81	1.86	2.21	TR61627-3	104.59	1.91	2.03
TR43041-1	227.42	1.85	2.33	TR61659-1	102.79	1.88	2.03
TR43041-2	193.82	1.78	1.92	TR61659-2	51.11	1.72	1.97

TR43041-4	143.81	1.85	2.24	TR61714-4	71.74	1.79	2.01
TR43105-3	152.69	1.82	2.29	TR61714-8	101.32	1.85	2.57
TR43105-6	156.04	1.80	2.14	TR61812-3	73.58	1.85	2.07
TR43105-8	127.84	1.75	1.62	TR61851-2	95.44	1.89	2.03
TR43135-10	167.94	1.97	2.49	TR61851-6	124.49	1.87	2.05
TR43135-2	154.57	1.84	2.32	TR62023-2	108.41	1.91	2.27
TR43135-9	223.49	1.83	2.02	TR62060-10	51.97	1.82	2.02
TR43263-9	62.26	1.75	1.76	TR62474-3	134.15	1.84	2.05
TR43265-5	134.91	1.86	2.20	TR63230-5	72.61	1.76	2.03
TR43722-6	238.46	1.86	2.02	TR64142-2	99.84	1.85	2.35
TR43744-8	153.75	1.81	1.96	TR64142-5	159.02	1.88	2.13
TR43746-9	142.95	1.84	2.49	TR64154-2	83.17	1.88	2.32
TR43749-1	234.49	1.90	2.09	TR64154-7	55.12	1.80	2.00
TR43835-2	85.59	1.81	2.38	TR64163-6	73.00	1.76	1.61
TR43835-3	215.74	1.86	2.16	TR66002-4	111.39	1.91	2.69
TR45791-3	150.86	1.90	2.01	TR66003-2	140.97	1.92	2.64
TR45791-5	100.81	1.91	2.22	TR66003-4	115.31	1.97	2.57
TR45883-2	276.03	1.84	2.04	TR66004-10	47.97	1.71	3.39
TR45883-6	281.69	1.84	2.08	TR66004-8	62.87	1.82	2.03
TR45883-8	70.20	1.69	2.09	TR66005-1	62.89	1.86	2.15
TR45896-1	248.65	1.84	2.03	TR66005-3	54.76	1.80	1.81
TR45896-4	129.16	1.84	2.16	TR66005-8	84.73	1.85	3.86
TR45896-5	1188.20	2.10	2.27	TR66007-7	157.62	1.94	2.70
TR45896-7	204.42	1.85	2.23	TR66008-10	92.43	1.82	1.87
TR46437-2	192.63	1.91	2.19	TR66008-8	56.58	1.74	3.86
TR46437-4	136.34	1.80	1.88	TR66362-9	105.76	1.85	2.04
TR46437-5	130.50	1.81	1.98	TR66366-1	81.90	1.85	2.30
TR46437-8	143.52	1.78	2.02	TR66366-2	117.64	1.90	2.11
TR46438-9	98.62	1.86	2.02	TR66755-3	103.41	1.84	2.04
TR46489-1	118.61	1.89	2.35	TR68913-2	206.32	1.96	2.24
TR46489-2	98.17	1.82	2.29	TR68913-3	66.09	1.85	2.11
TR46489-5	99.96	1.87	1.99	TR68934-5	126.21	1.87	2.14
TR46489-9	64.98	1.75	2.95	TR68934-7	54.90	1.86	2.37
TR46503-2	272.61	1.90	2.25	TR68940-10	105.53	1.86	1.99
TR46503-4	337.43	1.86	2.14	TR68940-9	92.25	1.86	2.05
TR46503-5	212.74	1.85	2.08	TR69022-1	37.62	1.84	1.88
TR47776-5	216.69	1.81	2.06	TR69425-1	60.03	1.72	1.88
TR47776-9	164.86	1.79	2.38	TR69425-4	61.85	1.81	3.18
TR47783-1	172.71	1.77	2.26	TR69425-8	101.44	1.81	2.09
TR47783-4	114.02	1.89	2.29	TR69428-1	53.69	1.82	2.54
TR47793-1	268.23	1.85	2.25	TR69428-2	101.49	1.85	2.14
TR47797-1	149.86	1.81	1.75	TR69689-9	98.55	1.91	2.62
TR47797-6	140.93	1.80	1.63	TR69873-7	116.74	1.86	2.33
TR47797-9	173.10	1.81	1.88	TR69873-9	150.11	1.89	2.03
TR47804-3	178.45	1.84	2.19	TR69895-1	53.63	1.89	2.45
TR47805-8	346.26	1.84	2.09	TR71500-5	69.61	1.85	2.17

TR47805-9	184.02	1.83	2.00	TR71540-4	66.94	1.85	2.08
TR47811-2	107.13	1.83	2.40	TR71540-5	77.44	1.94	2.36
TR47811-4	113.55	1.80	1.94	TR71541-1	88.00	1.80	2.23
TR47812-3	186.19	1.90	2.17	TR71541-4	103.77	1.90	1.97
TR47812-5	301.54	1.85	2.30	TR71568-2	49.82	1.89	2.86
TR47813-2	168.89	1.89	2.08	TR71571-1	101.78	1.79	1.98
TR47813-7	149.25	1.87	2.08	TR71571-3	100.79	1.82	1.90
TR47822-3	70.20	1.79	1.95	TR71616-1	92.02	1.81	2.00
TR47822-5	195.64	1.83	1.99				

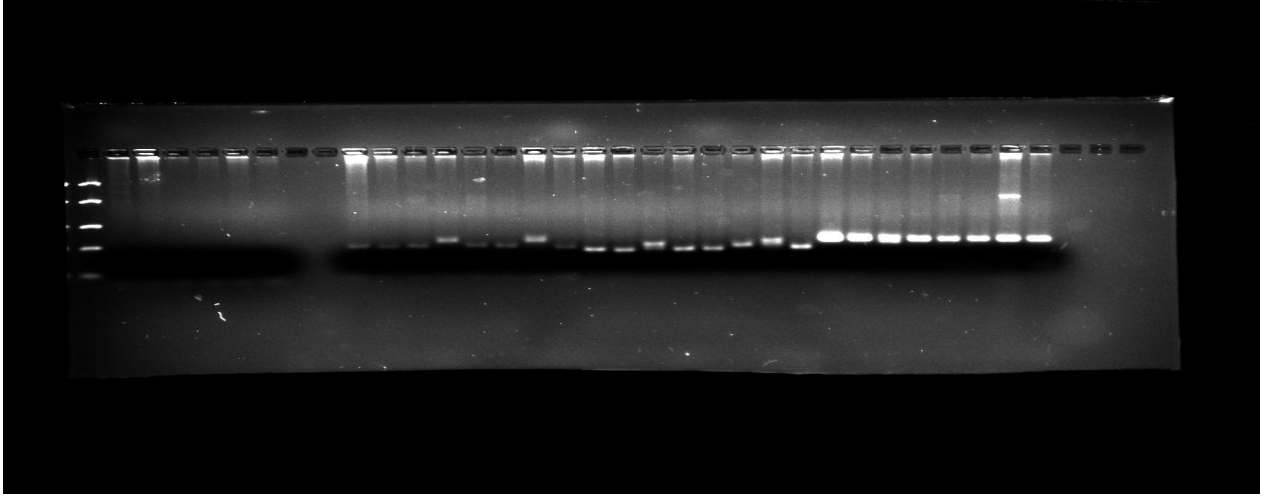
#### 4.2.2. SSR Analizleri

Moleküler çalışmalara öncelikle SSR analizleri ile başlanmıştır. Bu amaç için Cornell Üniversitesi tarafından geliştirilen 3522 adet kavun EST (Express Sequence Tags) dizileri SSR primerleri dizayn etmek amacıyla veritabanından indirilmiştir. 3522 EST dizileri özgün diziler olup birbirleriyle çakışmamaktadır (unigene) (<http://melon.bti.cornell.edu/melon/download/download.html>). SSR primer dizaynı için PBC Public SSR Primer Discovery Input adlı internet tabanlı bilgisayar yazılımı kullanılarak bu unigenlerin hepsi taranmıştır (<http://hornbill.cspplatrobe.edu.au/cgi-bin/pub/ssrprimer/indexssr.pl>). Bu taramalar sonucunda 3522 adet kavun unigeni arasından 428 adet SSR primeri bulunmuştur. PBC Public SSR Primer Discovery Input adlı internet tabanlı bu bilgisayar programı her SSR'ın yanındaki primerleri dizayn edebilme temeline dayanılarak programlanmıştır. Primer dizayn kriterleri olarak; primer boyutu, (minimum: 18 ve maksimum: 22 nükleotid), primer erime derecesi (T<sub>m</sub>, minimum:50°C- maksimum:70°C), primer GC yüzdesi (Minimum: 50%-Maksimum:70%), primer maksimum eşleşme oranı (=8) ve primer maksimum 3' ucu eşleşme oranı (=3) baz alınmıştır. Bulunan bu 428 SSR primerleri içinden tekrar sayısı (primer uzunluğu), sağ ve sol primer erime derecesi ve ürün boyutu gibi özellikler göz önünde bulundurularak en iyi 20 primer çifti seçilmiştir. Bu primerler ilgili bilgiler Tablo 1 de belirtilmiştir. Seçilen bu 20 SSR primerlerden 4 (%20) tanesi dinükleotid, 14 (%70) tanesi trinükleotid ve 2 (%10) tanesi pentanükleotid olmak üzere 3 tip nükleotid tekrarı içermiştir. Bu SSR'ların toplam uzunluğu 27 nükleotid ile 73 nükleotid arasında değişmektedir. Geliştirilen bu primerlerden sadece dört tanesi ((MU118, FR14G19, SSH6I23 ve PH8C1) bu çalışmada kullanılmıştır. PCR'ları yapılan primer ürünleri 1XTBE buffer içerisinde 120 Voltta yürütülmüştür. Bu yolla 20 primerden 11 tanesinin muhtemel polimorfizm seviyesi belirlenmiştir. Şekil 16 de iki adet muhtemel polimorfik SSR primeri görülmektedir. Şekil 16'dan de inceleneceği gibi agarose jele dayalı polimorfizm çalışmalarından istenilen düzeyde polimorfizm ortaya çıkmamıştır.



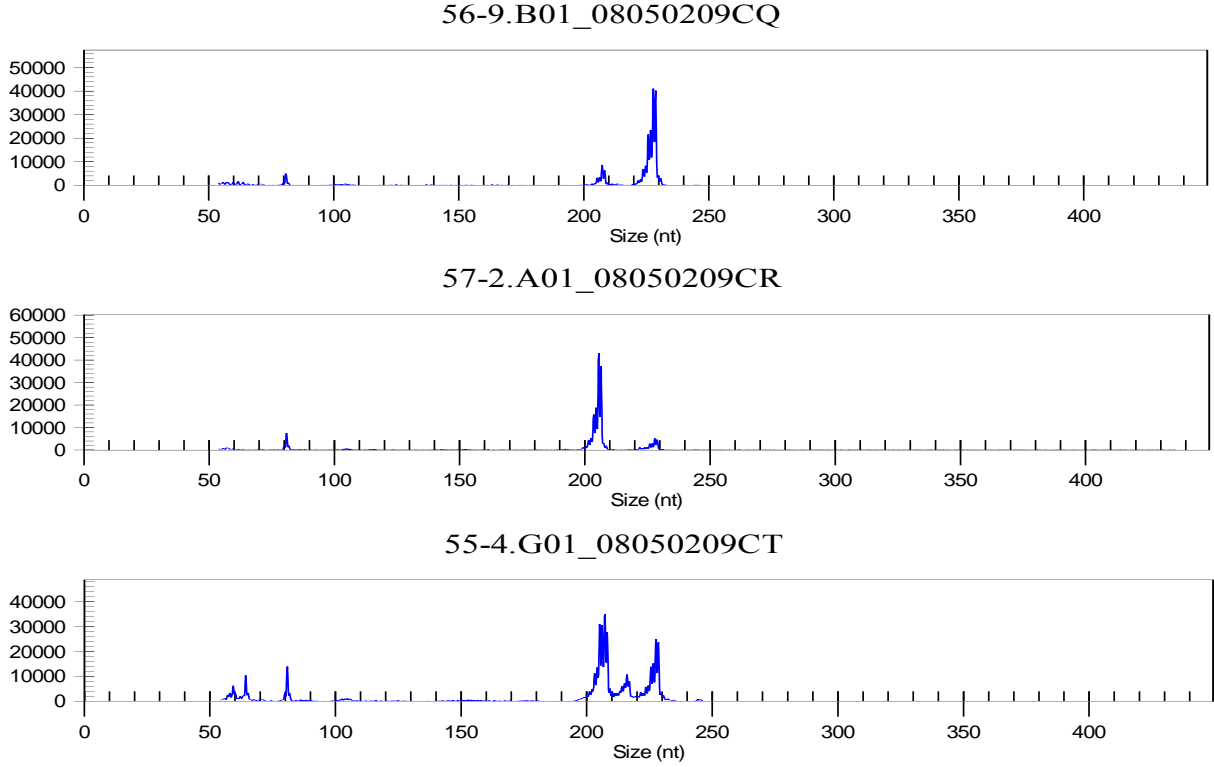
Şekil 16. Muhtemel polimorfik SSR primeri (Solda MU 181, sağda FR16A10). Oklar farklı seviyedeki polimorfik band boylarını göstermektedir.

Bu nedenle, SSR analizleri DNA dizi cihazı Beckman-Coulter CEQ8800 Genetic Analysis System kullanılarak kapillar olarak ayrıştırılmıştır. Öncelikle seçilen SSR markörlerinin kavun genotiplerinde çalışıp çalışmadığını kontrol etmek için her bir işaretleyici seçilmiş sekiz kavun tohum örneğinden elde edilen DNA'larda test edilmiştir. Test edilen 53 işaretleyiciden 4 (%7) tanesi hiç amplifikasyon (PCR ürünü) vermemiştir, 29 (%55) tanesi polimorfik bulunmamıştır ve 20 (%38) tanesi hatlar arasında polimorfik olarak belirlenmiştir. Şekil 17 polimorfizm için test edilen SSR markörlerinden elde edilen sonuçlara bir örnektir. Bu şekilde toplam 73 adet SSR işaretleyicisi küçük bir grup kavun örneğinde uygulanmıştır.



Şekil 17. Sekiz kavun örneğinde test edilen SSR işaretleyicileri örnekleri. 1. hat moleküler boyut standartını, 2-9 nolu hatlar kavun örneklerinde amplifike olmayan CMGA-15 SSR işaretleyicisini, 10-17 nolu hatlar polimorfik olan CMAGN-75 SSR işaretleyicisini, 18-25 nolu hatlar polimorfik olan MCGAN-21 SSR işaretleyicisini, 26-33 nolu hatlar polimorfik olmayan CMTAN-100 SSR işaretleyicisini göstermektedir.

Toplam 12 adet SSR işaretleyicisi ulusal kavun germplazmaları ve 12 türdışı kabakgil türleri arasındaki genetik çeşitliliği belirlemek için kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan SSR markörlerinin karakteristik özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Bu çalışmada kullanılan SSR markörlerinden 8 tanesi (CMCTN-5, CMCTN-86, CMGAN-25, CMCTN-35, CMAGN-68, CMGAN-80, TJ-10, TJ-27) daha önce yayınlanmış bazı yayınlardan, 4 tanesi ise yukarıda anlatılan dizayn edilmiş SSR işaretleyicileri içerisinde seçilmiştir (MU118, FR14G19, SSH6I23, PH8C1). Daha önce yayımlanmış makalelerden alınan SSR işaretleyiciler hakkındaki bazı bilgiler ve özellikleri KATZIR ve ark. (1996) ve DANIN-POLEG ve ark. (1997, 2000, 2001) tarafından tanımlanmıştır. Bu SSR işaretleyicilerinin hepsi polimorfik bulunmuştur. Bu işaretleyicilerden CMCTN-5'e ait Beckman DNA dizi analiz cihazı kullanılarak elde edilen lokus uzunluk değerleri Şekil 18'de gösterilmiştir.

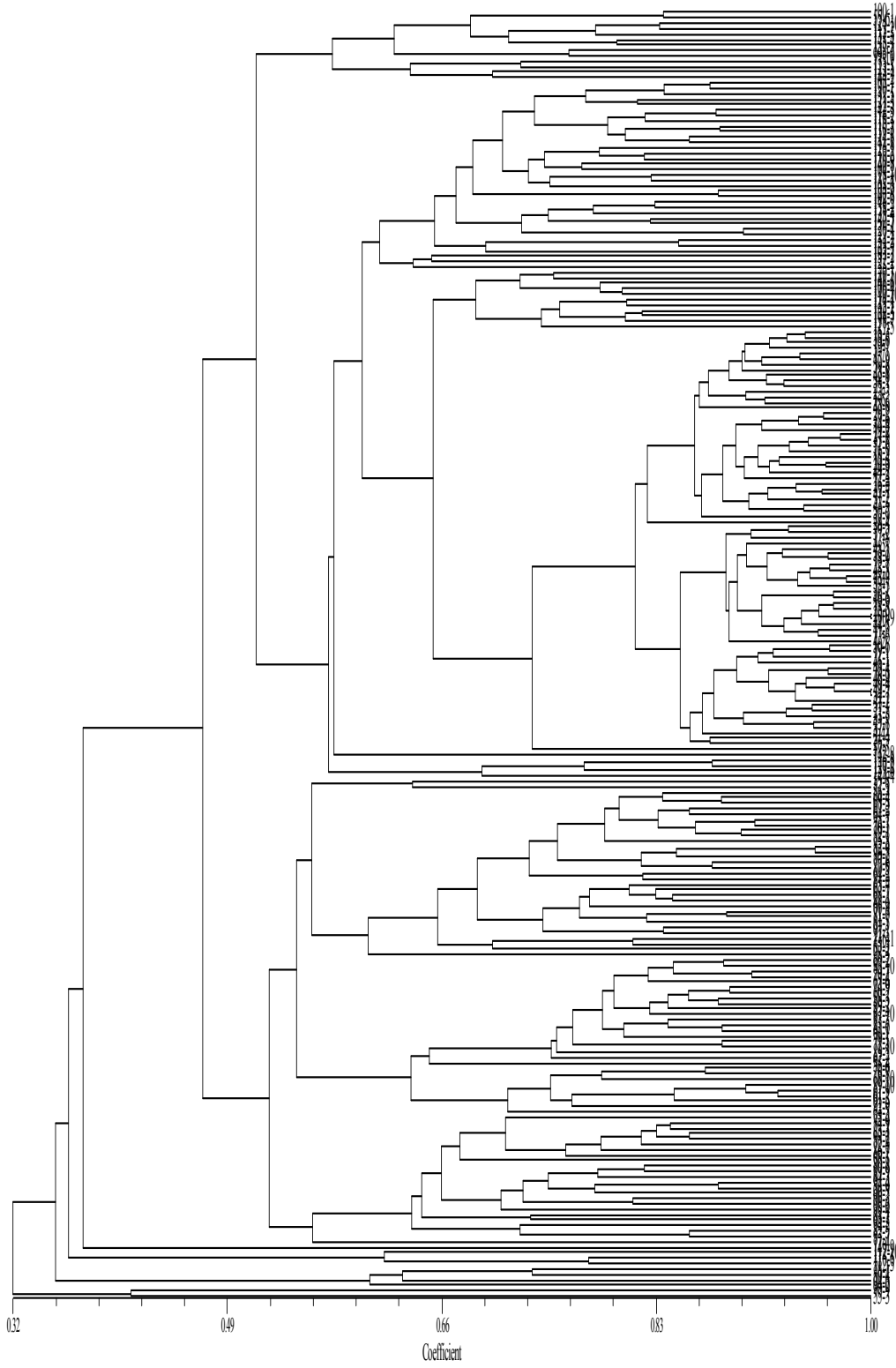


Şekil 18. CMCTN-5 SSR işaretleyicilerinin 56-9, 57-2 ve 55-4 numaralı örnekler üzerindeki sonuçları.

Seçilen 12 SSR primerlerinin hepsi polimorfik olup toplamda 93 adet polimorfik band vermiştir. Primer başına düşen polimorfik band sayısı yaklaşık olarak 7.3'tür. Bu rakam SSR markörleri kullanılarak daha önce yapılmış olan bazı kavun genetik çeşitlilik çalışmalarında bulunan primer başına düşen polimorfik band sayılarından daha yüksektir. Örneğin; LÓPEZ-SESÉ ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmada 15 İspanyol kavun hattında, genetik çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada 12 adet SSR primeri kullanılmış olup bunlardan sadece 8 tanesi polimorfik çıkmıştır. Bu polimorfik SSR primerleri ise toplamda 23 adet polimorfik allel elde edilmiştir (ortalama lokus başına 2.9 allel). MONFORTE ve ark. (2003) 27 kavun hattında yapmış olduğu genetik çeşitlilik çalışmasında 18 adet SSR primeri kullanmış ve 114 adet polimorfik lokus elde etmiştir. Lokus başına düşen polimorfik allel sayısı ise yaklaşık olarak 6.3'tür. NAKATA ve ark. (2005) 67 adet Japon kavun hattında, genetik çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla 12 adet SSR primeri kullanmış olup bunlardan sadece 9 tanesi polimorfik çıkmıştır. Polimorfik lokuslar ise toplamda 36 adet polimorfik allel vermiş olup lokus başına düşen polimorfik allel sayısı yaklaşık olarak 4'tür. SZABÓ ve ark. (2005) eski zamanlardan kalma 47 adet kavun hattının genetik çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla 20 adet SSR primeri kullanmış, bunlardan sadece 8 tanesi polimorfik çıkmıştır. Bu 8 lokus ise toplamda 40 adet polimorfik allel vermiş olup lokus başına ortalama 5 polimorfik allel düşmüştür. Yürütülmekte olan projeden ve önceden yapılan çalışmaların SSR işaretleyicilerinin (mikrosatellitlerinin), kavun için yüksek oranda polimorfizm verdiğini göstermektedir.

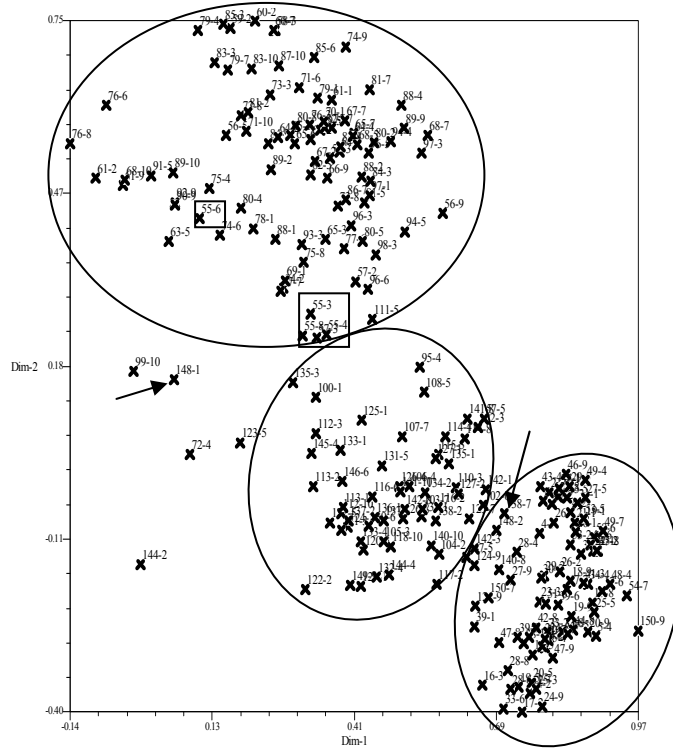
SSR sonuçlarına göre, 239 ulusal kavun hattına ait bir filogenetik ağaç DICE matrisi ve UPGMA (Unweighted Pair Group Method) aritmetik ortalama katsayısı kullanılarak SHAN modülüne göre, NTSYS-pc version 2.2 software programı kullanılarak çizilmiştir (Şekil 19). Farklı tipteki işaretleyiciler ile üretilen veriler arasındaki kıyaslama MANTEL testi (1967) kullanılarak yapılmıştır. Bu teste göre örneklere ait genotipik veriler ve dendogram arasındaki korelasyon kabul edilebilir sınırlardadır (0.80)'dir. Dendogram skalası 0.32 ile 1.00 arasında değişiklik göstermiş olup ortalama benzerlik skalası 0.66'dır. SSR işaretleyicileri kullanılarak yapılan çalışmada, sadece iki hat arasında tam bir benzerlik görülmüştür. 0.55 benzerlik skalasına göre, kavun hatları 10 grup altında toplanmıştır (Şekil 19). En büyük grup (grup B) hatların çoğunu (129 tohum örneği) içermektedir ve bu grup içerisindeki minimum benzerlik katsayısı yaklaşık olarak 0.57'dir. Grup C, D ve E, sırasıyla 33, 29 ve 24 tohum örneği içermektedir ve minimum benzerlik katsayıları Grup C ve E için ortalama 0.56, Grup D için 0.64'tür. Grup A 13 hat içermektedir ve minimum benzerlik katsayısı 0.58'dir. Geri kalan 5 grup (grup F, G, H, I ve J) sadece 1 - 4 arasında hat içermektedir. Grup I ve J en fazla farklılık gösteren hatları içermekte olup bu hatlarla grupta geri kalan hatlar arasındaki maksimum benzerlik 0.32 dir.

SSR verileri için temel bileşenler (PCA - Principal Component Analysis) analizi yapılmıştır. PCA'de birinci, ikinci ve üçüncü eksenler toplam varyansın, sırasıyla %33, %13 ve %8'ini açıklamıştır. Hem iki 2 ve hemde 3 boyutlu grafikler, kavun hatlarının 3 ana gruba ayrıldığını göstermiştir (Şekil 20 ve 21). İlginç bir şekilde, tek bir orijinal tohum örneğinden türemiş hatların genetik olarak birbirinden oldukça uzak olabileceklerini göstermiştir. Hatırlanacağı üzere, önerilen çalışmanın başlangıcında, bazı ulusal kavun hatlarının meyve şekilleri bakımından oldukça farklı morfolojik çeşitlilik gösterdikleri gözlenmiştir. Bu sebepten dolayı, herbir tohum örneğinden temsili hatlar ileri analizler için seçilmişlerdir. Bazı durumlarda, tek bir hattın (tohum örneği) seçilen bir çok hat öncelikle kendilenmiş ve daha sonra kendilenmiş tohumlar yeniden ekilerek moleküler genetik çeşitlilik analizlerinde kullanılmışlardır. Bu genotiplerin bazıları 2 ve 3 boyutlu gösterimlerde gruplar oluştururken, diğerleri kardeş hatlarıyla daha uzak akrabalık ilişkisi göstermişlerdir. Bu durumla ilgili bir örnek Şekil 20'de verilmiştir. Büyük kutu, 55 numaralı hattın seçilmiş ve genetik bakımdan birbiri ile benzer olan ve aynı grup içerisinde yer alan 3 genotipi içermektedir (55-3, 55-4 ve 558). Küçük kutu ise aynı hattın seçilen 55-6 nolu örnek genetik olarak diğer genotiplerden oldukça farklılık göstermektedir. Bir diğer sıradışı (ekstrem) örnek ise 148 nolu hattın türetilmiş genotiplerde görülmüştür. Genotiplerden biri (148-2) büyük grupların birinde yer alırken, diğer genotip (148-1) bu grupların oldukça dışında kalmıştır (Şekil 20). Sonuç olarak ulusal kavun koleksiyonunda yer alan ve tek bir tohum örneği olarak sınıflandırılan germplazmların bazıları aslında genetik ve morfolojik olarak farklı materyalleri temsil etmektedirler.

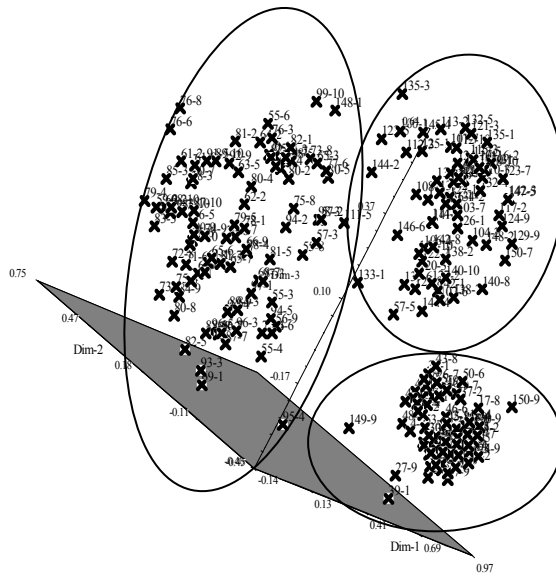


Şekil 19. 239 kavun hattında SSR sonuçlarına göre oluşturulan filogenetik ağaç





Şekil 20. 239 kavun hattında SSR sonuçlarına göre oluşturulan 2 boyutlu gösterim.



Şekil 21. 239 kavun hattında SSR sonuçlarına göre oluşturulan 3 boyutlu gösterim.

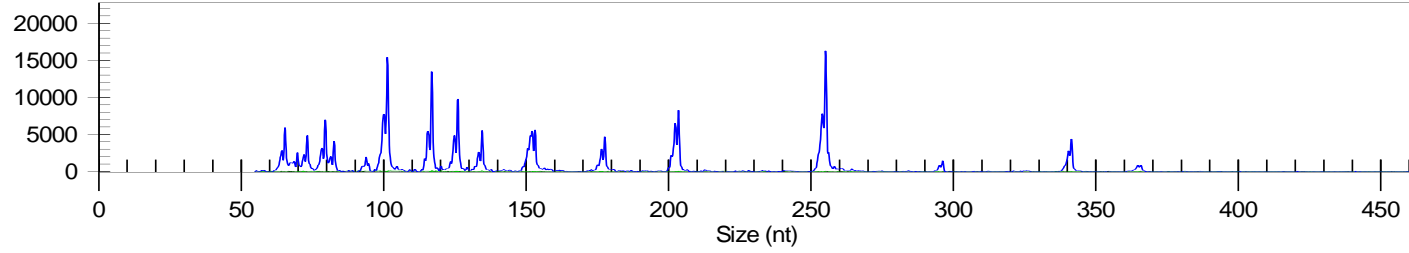
### 4.2.3. AFLP Analizleri

AFLP analizleri çok basamaklı bir işlem olup, tutarlı ve yeniden elde edilebilir sonuçlar toplamak için her bir basamağı dikkatli bir şekilde kontrol edilmelidir. Şekil 22’de tutarlı ve yeniden elde edilebilirlik ile ilgili başlangıçta karşılaşılan problemler görülmektedir. Bazı örnekler zayıf sinyal vermiştir. Sinyal zayıf olduğu ve geri sinyali çok yüksek olduğu için diğer bazı örnekler analiz edilememiştir. Bu sorunlar bazı örnek hacimlerinin sabit olmadığını göstermektedir. Sorunun çözümü için 96 gözlü PCR tabaklarına yükleme yapmak ve sekans basamaklarında pipetleme hatalarını azaltmak için multipipetör kullanılmıştır. Buna ek olarak, örnek karışımları gerektiğinde tüm örnekler tüplerin dip kısmında çöklediğinden ve vorteksleme sırasında kaybolmadığından emin olmak için tabaklar önce santrifüjlenmiştir. Daha sonra tabaklar vortekslenmiş ve yeniden santrifüjlenmiştir. Sonuç olarak, daha tutarlı ve yeniden elde edilebilir AFLP sonuçları elde edilmiştir (Şekil 23). Çalışmada toplam on adet AFLP primer kombinasyonu (*MseICTC/EcoRIAAC*, *MseICTC /EcoRIAAG*, *MseICTC/EcoRIACA*, *MseICTA/EcoRIACG*, *MseICTA/EcoRIACC*, *MseICTA/EcoRIACT*, *MseICAT/ EcoRIAAG*, *MseICAT/EcoRIACA*, *MseICAC/ EcoRIAAC* ve *MseICAC/EcoRI AAG*), 239 kavun tohum örneği (Tablo 3) ve türdışı 12 farklı (Tablo 4) genotip arasındaki genetik çeşitliliği tayin etmek amacı ile kullanılmıştır. AFLP analizde kullanılan primer kombinasyonlarının özellikleri Tablo 6’da gösterilmiştir. Bu tabloya göre; AFLP kombinasyonlarının hepsi polimorfik özellikte olup toplamda 345 polimorfik DNA parçacığı (band) üretmiştir. Kombinasyon başına düşen ortalama polimorfik band sayısı 34.5’tir. *MseICAT/EcoRIAAG* primer kombinasyonu 58 polimorfik band ile en çok band veren AFLP kombinasyonu olmuştur. Diğer taraftan, *MseICTA/EcoRIACC* primer kombinasyonu 21 polimorfik band ile en az band veren AFLP kombinasyonu olmuştur. Herbir AFLP kombinasyonu başına düşen polimorfik band sayısı Tablo 7’de verilmiştir. Bu polimorfik parçacıkların (bandlar) uzunluğu 60 ile 640 baz çifti (bp) arasında değişmiştir.

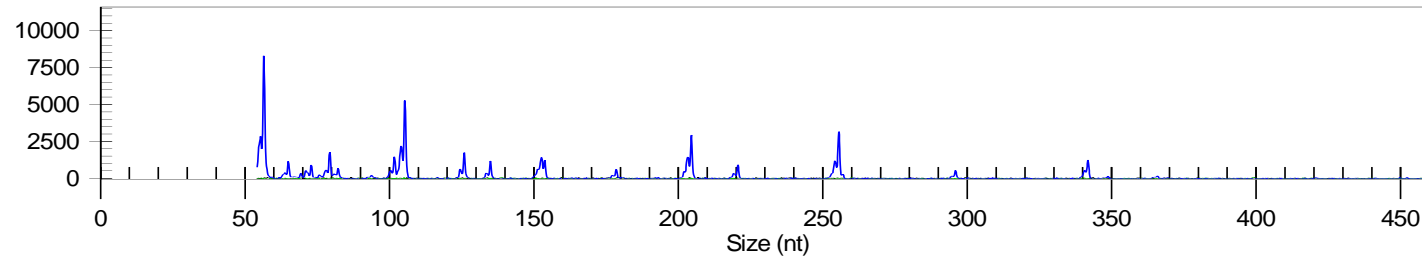
Tablo 6. Kavun tohum örneklerinin genetik çeşitliliğinin belirlenmesi analizinde kullanılan AFLP kombinasyonlarının özellikleri.

Toplam AFLP primer kombinasyonlarının sayısı	Polimorfik kombinasyon sayısı	Polimorfik primer yüzdesi (%)	Toplam polimorfik band sayısı	Kombinasyon başına düşen ortalama polimorfik band sayısı
10	10	100	345	34.5

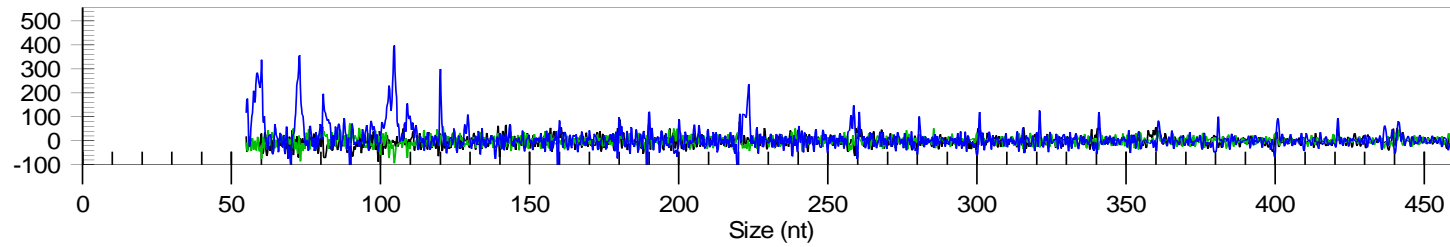
5-4.H02\_08021409V4



4-4.A01\_08021409UN

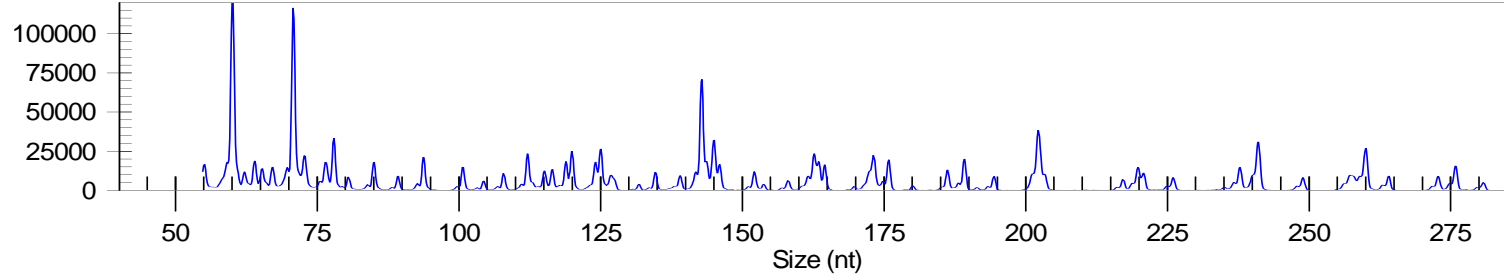


9-5.D03\_08021409V9

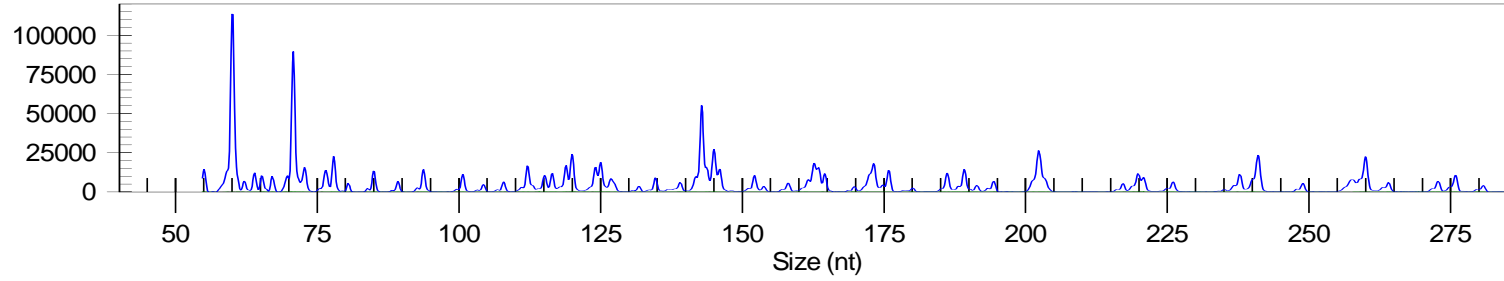


Şekil 22. Üç kavun örneği ile yapılan kabul edilebilir ve ret edilen AFLP çalışma sonuçları. İlk örnek kabul edilebilir düzeydedir. İkinci örnek zayıf sinyal vermiştir ve dolayısıyla, düşük sinyal değerine sahiptir. Üçüncü örnek çok fazla miktarda noise içermektedir.

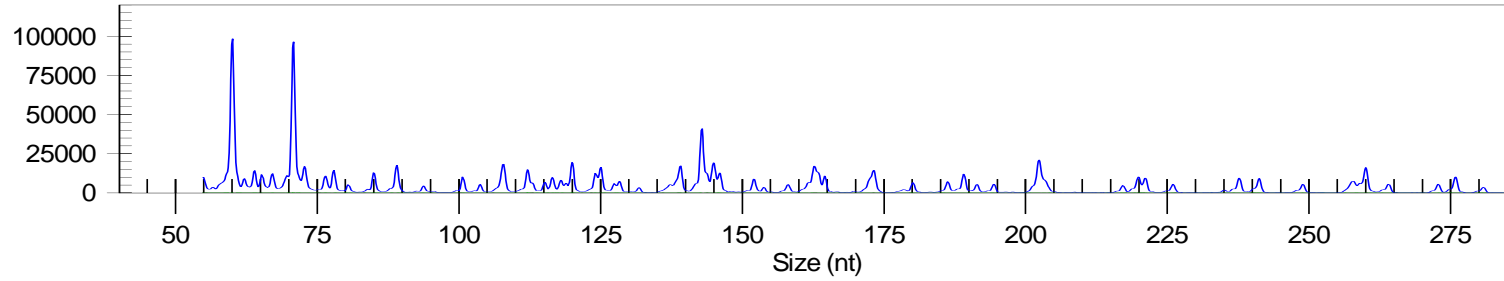
6-1.F02\_08022914DI



6-4.E02\_08022914DJ



7-1.D02\_08022914DL



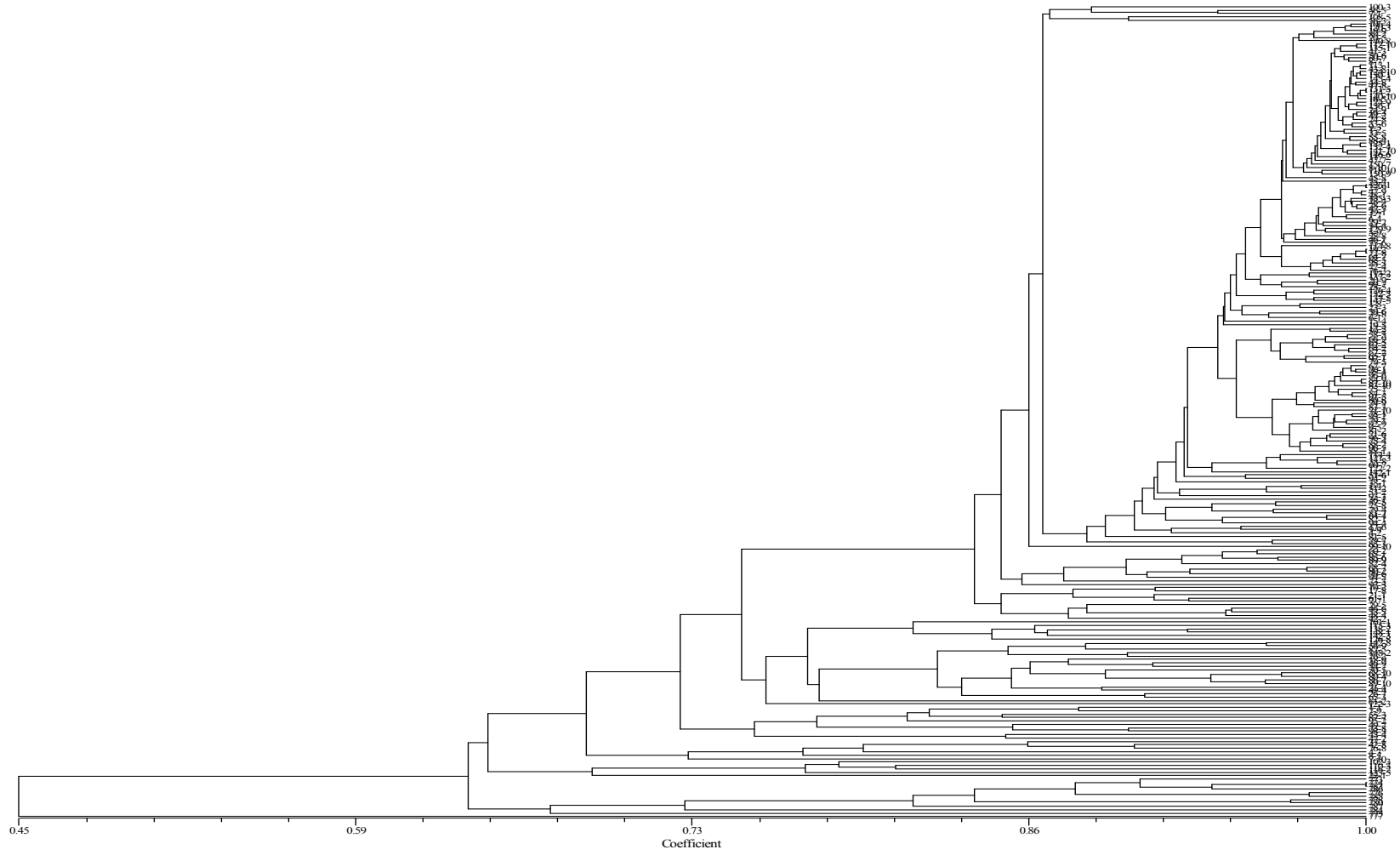
Şekil 23. Üç kavun DNA örneği ile yapılan kabul edilebilir AFLP resimleri. Ok işareti iki kavun örneğinde mevcut ve bir kavun örneğinde mevcut olmayan polimorfik parçacık uzunluğunu göstermektedir.

Tablo 7. Herbir AFLP kombinasyonu başına düşen polimorfik band sayısı.

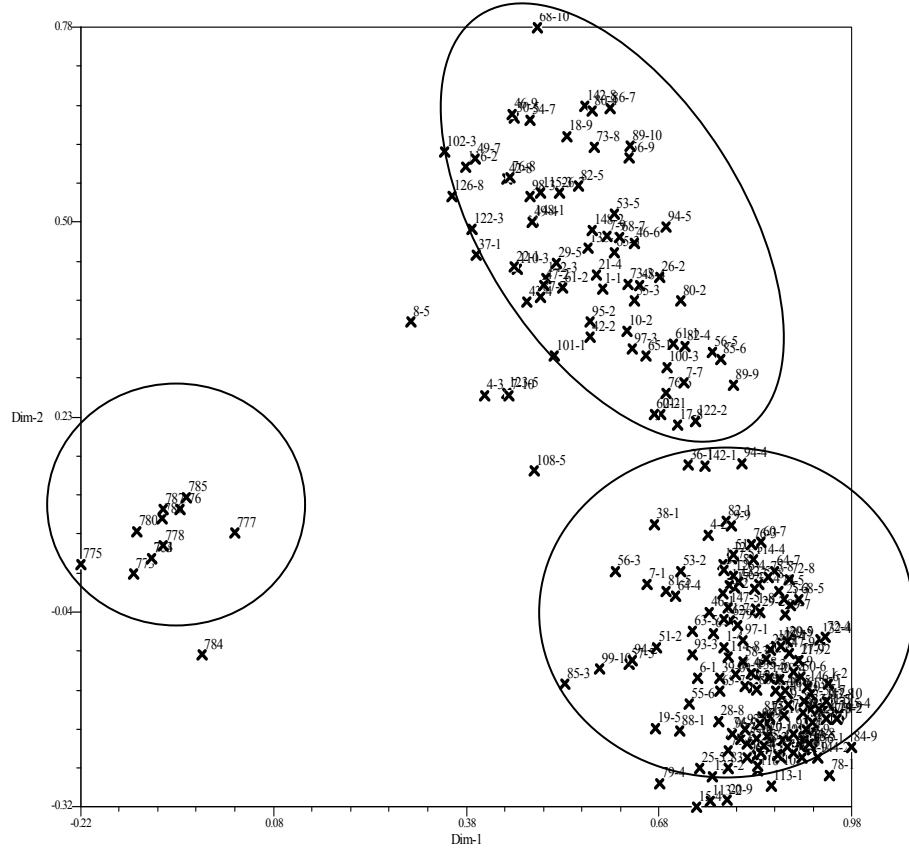
AFLP Kombinasyonları	Polimorfik DNA parçacık (band) sayısı
MseI-CTC/EcoRI-AAC	37
MseI-CTC/EcoRI-AAG	36
MseI-CTC/EcoRI-ACA	31
MseI-CTA/EcoRI-ACG	29
MseI-CTA/EcoRI-ACC	20
MseI-CTA/EcoRI-ACT	28
MseICAT/EcoRI-AAG	58
MseICAT/EcoRI-ACA	36
MseICAC/EcoRI-AAC	31
MseICAC/EcoRI-AAG	39

AFLP sonuçlarına göre, 239 kavun tohum örneği (genotipi) ve 12 farklı türdışı kabakgöl üyesi türler için filogenetik ağaç; NTSYS-pc 2.2 software programında, DICE matrisi temel olarak alınıp, SHAN modülünde, UPGMA (Unweighted Pair Group Method) aritmetik ortalaması kullanılarak oluşturulmuştur (Şekil 24). Farklı işaretleyicilerle oluşturulan nümerik datanın karşılaştırılması MANTEL testi (1967) ile yapılmıştır. Bu teste göre, genotipik veriler ile dendogram arasındaki korelasyon oldukça yüksek bulunmuştur ( $r = 0.92$ ). Dendogram skalası 0.45 ile 1.00 arasında olup, ortalama benzerlik 0.73'tür. Bu değerlere göre, kavun genotipleri 10 değişik grup altında toplanmıştır (Şekil 24). En büyük grup, grup A, 188 kavun genotipi (tohum örneği) ile en fazla hattı içeren grup olmuştur. Bu grup içerisindeki en küçük benzerlik oranı yaklaşık 0.75'tir. Grup B (18 kavun hattı) ve Grup G (14 kavun hattı), sırasıyla, 0.75 ve 0.81 benzerlik oranlarıyla en düşük benzerliğe sahip gruplardır. Grup C ve E 8 hat içermekte olup birbirleri ile en az benzerlik gösteren gruplardır (0.775). Geri kalan gruplar ise sadece 1 hat içermektedir. Türdışı kabakgöl üyeleri arasındaki gruplamada ise, en düşük benzerlik yaklaşık olarak 0.45 bulunmuştur. PCA (Principal Component Analysis = temel bileşenler analizi) analizi yapılmış ve 2D ve 3D gösterimleri çizilmiş ve bunlar Şekil 25 ve Şekil 26'da gösterilmiştir. PCA analizi sonucu oluşturulan birinci, ikinci ve üçüncü eksenler sırası ile toplam değişikliğin (varyasyonun), sırasıyla, %54, %8 ve %5'ini açıklamaktadır. Çok yönlü gösterimlerin (2D ve 3D) her ikisinde *Cucumis melo* tohum örneklerine kıyasla türdışı kabakgöl üyelerini açıkça ayrı grublamaştır. Bunlara ek olarak 2D gösteriminde kavun hatlarının iki ana gruba ayrıldığıda açıkça görülmektedir. AFLP verileri kullanarak türdışı genotiplerin gruplanmasını taksonomileri ile uyumlu olup olmadıklarını görmek için filogenetik ağaç ve 2D gösterimi sadece bu genotipler için çizilmiştir (Şekil 27 ve 28). Genel olarak, bu sonuçlar, beklendiği gibi aynı türe ait genotiplerin gruplaştıklarını göstermektedir. Örneğin, Şekil 27'te görüldüğü üzere, iki bileşenli PCA *Luffa*, *Cucumis moschata* ve *C. melo* subsp. *flexuosus*'a ait iki genotip çiftler halinde gruplar oluşturmuştur. Filogenetik ağacı oluşturan bireylerin çok fazla sayıda olmasından dolayı, bu bireylerin ayrılma zorluğunu ortadan kaldırmak için daha az bireyle ayrı bir analiz yapılmıştır. Bu analiz için, tek bir tohum örneği birbiriyle %90'dan fazla benzerlik gösteren kavun hatları içerisinde genotipi temsilen seçilmiştir. Bu yolla, 239 olan hat sayısı 54'e düşürülmüş olup 54 kavun hattı ile 12 farklı kabakgöl ailesi üyesinin analizi yapılmıştır. Bu filogenetik ağaç ( $r = 0.95$ ), kavun hatları ile farklı kabakgöl üyeleri arasındaki ayrımı %55 oranındaki genetik benzerlik oranıyla göstermektedir (Şekil 27, 28). Kavun hatları

arasındaki en küçük benzerlik % 64'tür. 2D (Şekil 29) ve 3D (Şekil 30) gösterimleri de farklı kabakgil üyelerinin kavun (*Cucumis melo*) hatlarından daha uzakta ayrı bir grup oluşturduğunu göstermektedir (Şekil 31).

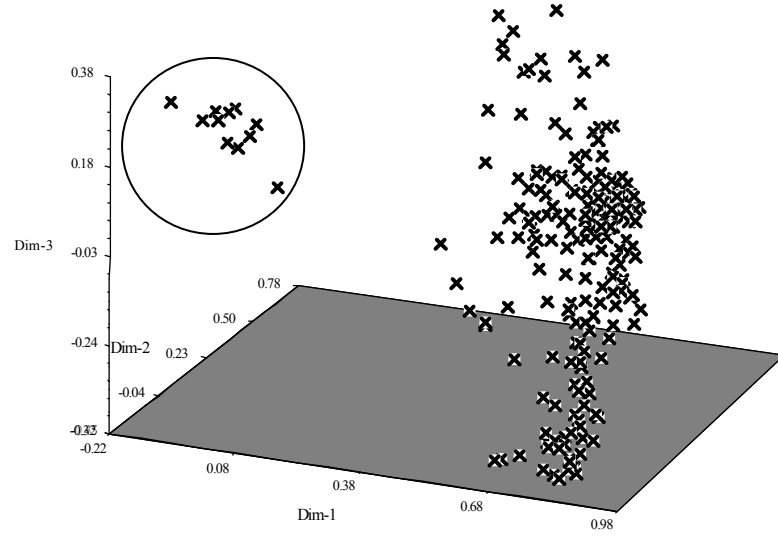


Şekil 24. 239 ulusal kavun hattı ve 12 farklı kabakgil üyeleri ile yapılan AFLP sonuçlarına göre oluşturulan filogenetik ağaç.

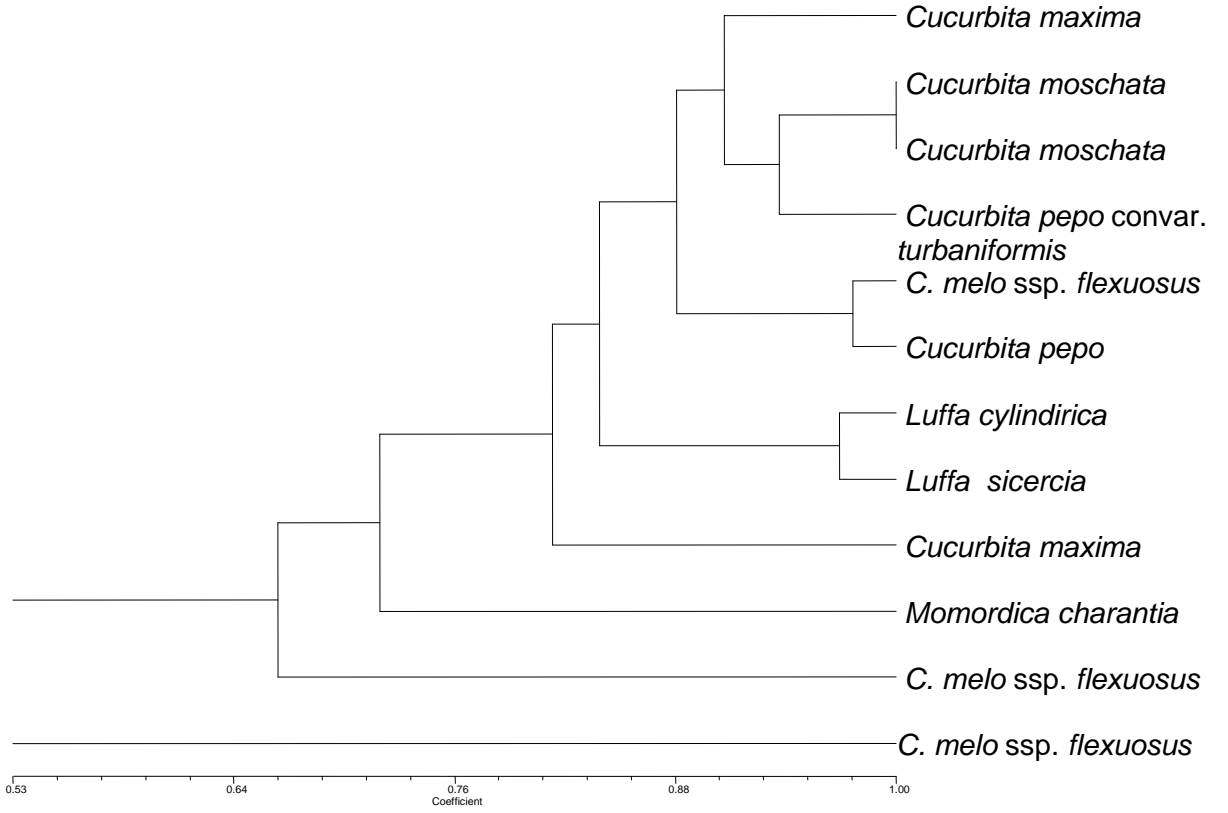


Şekil 25. AFLP sonuçlarına göre oluşturulan 239 ulusal kavun hattı ile 12 farklı kabakgil üyeleri arasındaki 2D gösterimi. Farklı kabakgil üyeleri ile kavun hatlarının oluşturduğu gruplar daire içinde gösterilmiştir.

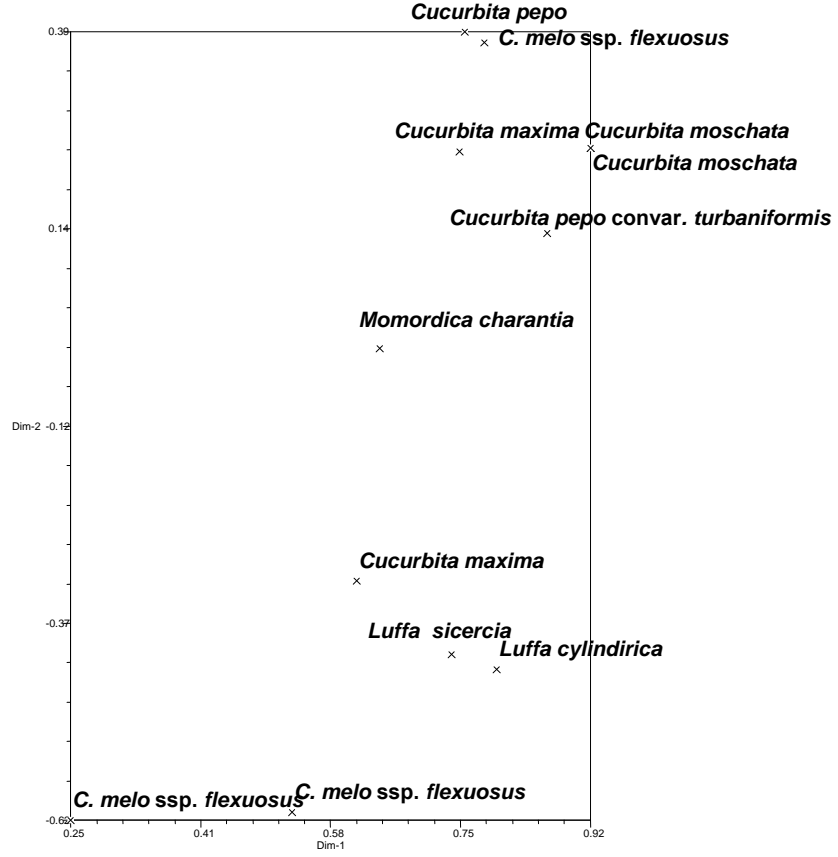




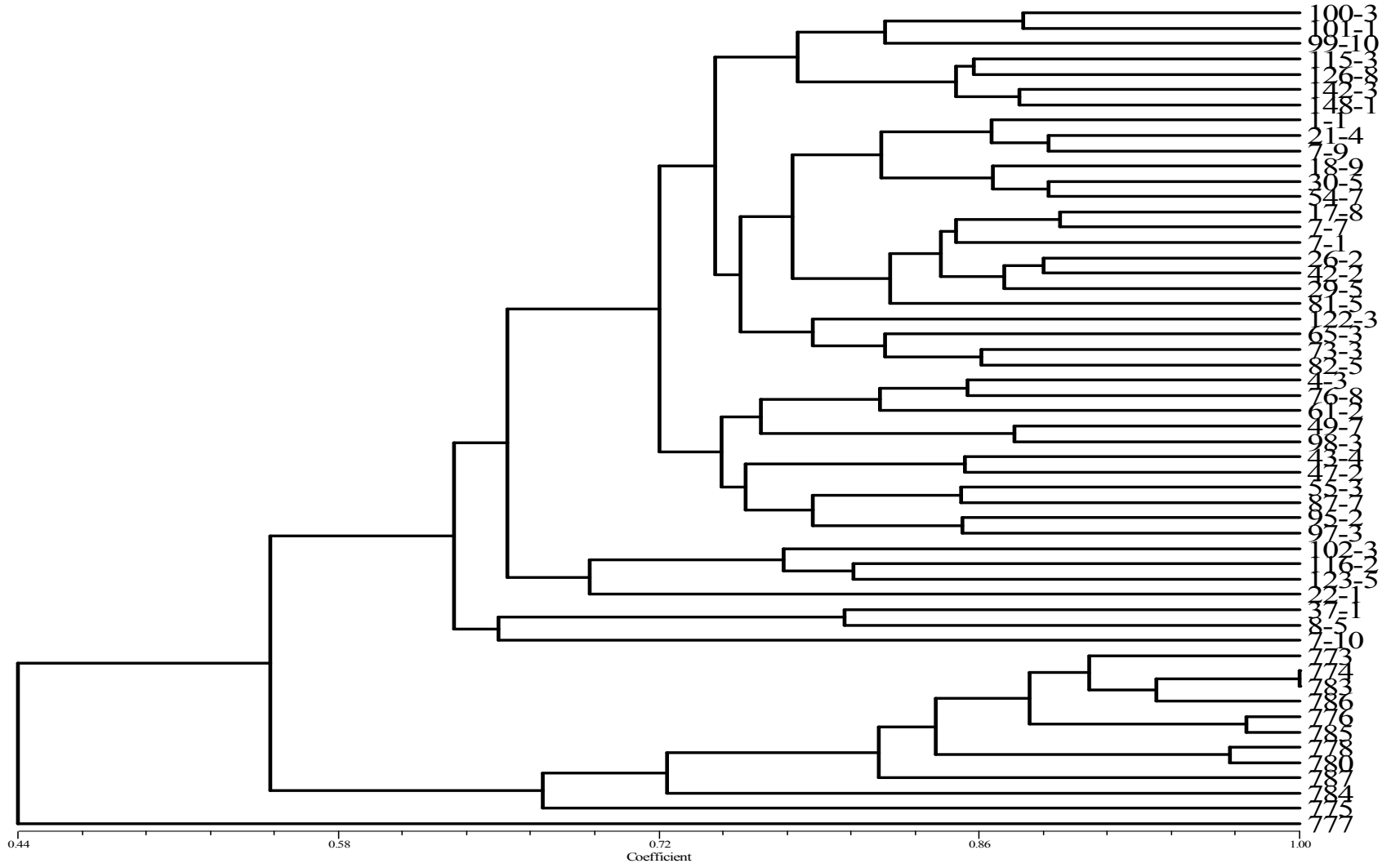
Şekil 26. AFLP sonuçlarına göre oluşturulan 239 ulusal kavun hattı ile 12 farklı kabakgil üyeleri arasındaki 3D gösterimi. Farklı kabakgil üyeleri arasındaki gruplar daire içinde gösterilmiştir.



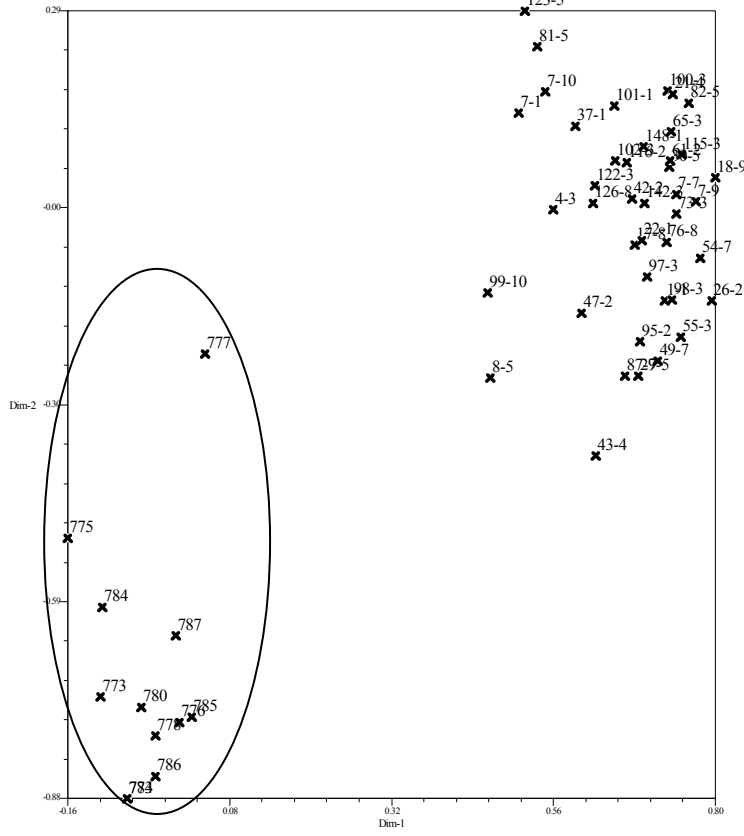
Şekil 27. Farklı türdışı kabakgil üyeleri arasında AFLP sonuçlarına göre oluşturulan filogenetik ağaç.



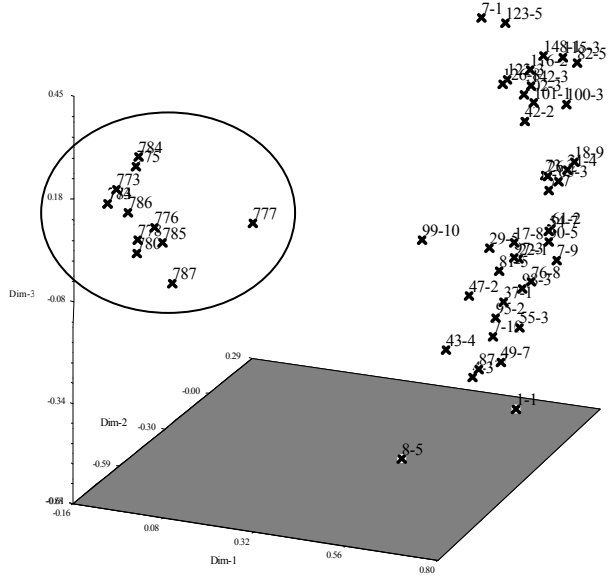
Şekil 28. Kavun germplazm koleksiyonunun filogenetik analizinde kullanılan türdışı kabakgil üyelerinin AFLP sonuçlarına göre oluşturulan 2D gösterimi.



Şekil 29. Azaltılmış sayıdaki kavun tohum örnekleri (54) ile türdışı farklı kabakgil türlerinin (12) AFLP sonuçlarına göre oluşturulan filogenetik ağacı.



Şekil 30. İndirgenmiş data setinin AFLP sonuçlarına göre 2D gösterimi. Farklı kabakgil üyeleri daire içinde gösterilmiştir.



Şekil 31. İndirgenmiş data setinin AFLP sonuçlarına göre 3D gösterimi. Farklı kabakgil üyeleri daire içinde gösterilmiştir.

## 5. Sonuç

Türkiye sahip olduğu genetik kaynaklarla oldukça zengin bir ülke konumundadır. Genetik kaynakların ortadan kalkmadan toplanması, karakterizasyonu ve gen bankalarında muhafaza altına alınması sürdürülebilir tarım için çok önemlidir. Ülkemizde ETAE’de kurulu bulunan Ulusal Gen Bankası genetik kaynakların toplanması, muhafazası ve karakterizasyonu ile ilgili faaliyetlerde görevlendirilmiş tek kuruluş durumdadır. Gen bankasında toplanan genetik kaynakların karakterizasyonu oldukça pahalı, çok zaman ve emek isteyen işlemlerdir. Gen bankalarında muhafaza altına alınan ve idmeleri için sürekli olarak çoğaltılmaları gereken genetik kaynakların aslında çoğunun birbirinin kopyası olduğu da düşünüldüğünde harcanan emek ve paranın önemli bir kısmının aslında gereksiz olduğuda aşıkardır. Bunun yanı sıra, morfolojik karakterler esas alınarak yapılan karakterizasyon çalışmalarından her zaman doğru sonuçlar çıkmayabilmektedir. Bu durum özellikle kalıtım derecesi düşük karakterler kullanıldığında daha belirgin olmaktadır. Dolayısıyla, son yıllarda moleküler markörlerin genetik çeşitlilik analizlerinde kullanımı hızla yaygınlık kazanmıştır. Bu analizler için değişik markör sistemleri kullanılmaktadır. Moleküler markörler kullanılarak projeye konu teşkil eden kavun bitkisinde de bir çok genetik çeşitlilik analizleri yapılmıştır. Çalışmada, Ulusal Gen Bankası’ndan temin edilen yaklaşık 250 civarında kavun genotipi ve Çukurova Üniversitesi’nden sağlanan 12 tür dışı genotip morfolojik olarak 35 karakter bakımından ve moleküler olarak SSR ve AFLP markör sistemleri ile karakterize edilmiştir. Morfolojik karakterler kullanılarak yapılan çalışmalarda özellikle genel büyüme şekli, yaprak, çiçek ve tohum karakterleri için popülasyonlarda çok az düzeyde yada hiç varyasyon gözlenmemiştir. Ancak, meyve karakterleri için popülasyonda oldukça geniş boyutlu bir varyasyon olduğu gözlenmiştir. Gen Bankasında muhafaza altına alınan materyallerin büyük bir kısmı popülasyon olarak tutulduğu için muhtemel tohum karışımlarından kaynaklanacak problemleri çözmek için çalışmada kullanılan bütün genotipler kendilenmiştir ve genetik analizler kendilenmiş tohumlar kullanılarak yapılmıştır. Morfolojik analizler ise her bir genotip içerisinde tip dışı olan genotipler popülasyondan uzaklaştırıldıktan sonra veriler toplanmıştır. Morfolojik karakterler (olgunlaşma zamanı, meyve şekli, meyve zemin rengi, ikinci meyve rengi, kabuk deseni, meyve ağırlığı, et kalınlığı, et rengi ve et tadı) kullanılarak yapılan gruplama (Cluster) analizleri sonucunda kavun genotiplerinin incelenen karakterlere göre gruplar içerisinde çok yüksek benzerlik oranı göstererek 5 grup içerisinde olduğu belirlenmiştir. Gruplama kavun örneklerinin geografik orijinleri ile ilişkili bulunmamıştır. SSR sonuçlarına göre, 239 kavun genotipi 10 grup altında toplanmıştır. SSR verileri için temel bileşenler (PCA - Principal Component Analysis) analizi yapılmıştır. PCA’de birinci, ikinci ve üçüncü eksenler toplam varyansın, sırasıyla %33, %13 ve %8’ini açıklamıştır. Hem iki 2 ve hemde 3 boyutlu grafikler, kavun hatlarının 3 ana gruba ayrıldığını göstermiştir. İlginç bir şekilde, tek bir orijinal tohum örneğinden türemiş hatların genetik olarak birbirinden oldukça uzak olabileceklerini göstermiştir. Hatırlanacağı üzere, önerilen çalışmanın başlangıcında, bazı ulusal kavun hatlarının meyve şekilleri bakımından oldukça farklı morfolojik çeşitlilik gösterdikleri belirtilmiştir. Bu sebepten dolayı, herbir tohum örneğinden temsili hatlar ileri analizler için seçilmişlerdir. Bazı durumlarda, tek bir hattın (tohum örneği) seçilen bir çok hat öncelikle kendilenmiş ve daha sonra kendilenmiş tohumlar yeniden ekilerek moleküler genetik çeşitlilik analizlerinde kullanılmışlardır. Bu genotiplerin bazıları 2 ve 3 boyutlu gösterimlerde gruplar oluştururken, diğerleri kardeş hatlarıyla daha uzak akrabalık ilişkisi göstermişlerdir. Sonuç olarak ulusal kavun koleksiyonunda yer alan ve tek bir tohum örneği olarak

sınıflandırılan germplazmların bazıları aslında genetik ve morfolojik olarak farklı materyalleri temsil etmektedirler. AFLP sonuçlarına göre, 239 kavun genotipi 10 değişik grup altında toplanmıştır. PCA analizi sonucu oluşturulan birinci, ikinci ve üçüncü eksenler sırası ile toplam değişikliğin (varyasyonun), sırasıyla, %54, %8 ve %5'ini açıklamaktadır. Çok yönlü gösterimlerin (2D ve 3D) her ikisinde *Cucumis melo* tohum örneklerine kıyasla türdışı kabakgil üyelerini açıkça ayrı grublamaştır. Bunlara ek olarak 2D gösteriminde kavun hatlarının iki ana gruba ayrıldığıda açıkça görülmektedir. AFLP verileri kullanarak türdışı genotiplerin gruplanmasını taksonomileri ile uyumlu olup olmadıklarını görmek için filogenetik ağaç ve 2D gösterimi sadece bu genotipler için çizilmiştir. Genel olarak, bu sonuçlar, beklendiği gibi aynı türe ait genotiplerin gruplaştıklarını göstermektedir. Bu tür gruplama analizleri germplazm araştırmacılarının tohum çoğaltılması amacıyla genetik olarak en farklı genotipleri belirlemesi için faydalıdır. Ayrıca, gruplama analizleri morfolojik karakterler için yapılacak ıslah çalışmalarında kullanılmak üzere yeni allel kombinasyonlarına sahip olan çeşitlerin geliştirilmesi amacıyla en özgün örnekleri seçmesi açısından bitki ıslahçıları içinde oldukça faydalıdır.



## Kaynaklar

1. FULTON, T.F., CHUNWONGSE, J., TANKSLEY, S. D. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol Biol Rep* 13: 207-209, (1995).
2. BAUDRACCO-ARNAS, S., PITRAT, M. A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) with RFLP, RAPD, isozyme, disease resistance and morphological markers. *Theor Appl Genet* 93:57-64, (1996).
3. DANIN-POLEG, Y., REIS, N., TZURI, G., KATZIR, N. Development and characterization of microsatellite markers in *Cucumis*. *Theor Appl Genet* 102:61-72, (2001).
4. DIJKHUIZEN, A., KENNARD, W. C., HAVEY, M. J., STAUB, J. E. RFLP variability and genetic relationships in cultivated cucumber. *Euphytica* 90:79-89, (1996).
5. GARCIA-MAS, J., OLIVER, M., GOMEZ-PANIAGUA, H., de VICENTE, M. C. Comparing AFLP, RAPD, and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. *Theor Appl Genet* 101:860-864, (2000).
6. HARLAN, J. R. Anatomy of gene centers. *Am Nat* 85:95-103, (1951).
7. KATZIR, N., DANIN-POLEG, Y., TZURI, G., KARCHI, Z., LAVI, U., CREGAN, P. B. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. *Theor Appl Genet* 93:1282-1290, (1996).
8. KIRKBRIDE, J. H. Biosystemic Monograph of the Genus *Cucumis* (Cucurbitaceae), Parkway Pub, Boone, NC, USA, (1993).
9. KNERR, L. D., STAUB, J. E., HOLDER, D. J. MAY, B. P. Genetic diversity in *Cucumis sativus* assessed by variation at 18 allozyme loci. *Theor Appl Genet* 78:119-128, (1989).
10. KNERR, L. D., STAUB, J. E. Inheritance and linkage relationships of isozyme loci in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Theor Appl Genet* 84:217-224, (1992).
11. KUCUK, A., ABAK, K., SARI, N. Cucurbit genetic resources collections in Turkey. In: Diez MJ, Pico B, Nuez F (eds), *Cucurbit Genetic Resources in Europe*, IPGRI, Rome, Italy, pp 46-51, (2002).
12. LOPEZ-SESE, A. I., STAUB, J., KATZIR, N., GOMEZ-GUILLAMON, M. L. Estimation of between and within accession variation in selected Spanish melon germplasm using RAPD and SSR markers to assess strategies for large collection evaluation. *Euphytica* 127:41-51, (2002).
13. MEGLIC, V., SERQUEN, F., STAUB, J. E. Genetic diversity in cucumber (*Cucumis sativus* L.): I. a reevaluation of the U.S. germplasm collection. *Genetic Res Crop Evol* 43: 533-546, (1996).
14. MLIKI A, STAUB, J. E., ZHANGYONG, S., GHORBEL, A. Genetic diversity in melon (*Cucumis melo* L.): an evaluation of African germplasm. *Genetic Res Crop Evol* 48:587-597, (2001).
15. MLIKI A, STAUB, J. E., ZHANGYONG, S., GHORBEL, A. Genetic diversity in African cucumber (*Cucumis sativus* L.) provides potential for germplasm enhancement. *Genetic Res & Crop Evol* 50:461-468, (2003).
16. MONFORTE, A. J., GARCIA-MAS, J., ARUS, P. Genetic variability in melon based on microsatellite variation. *Plant Breed* 122:153-157, (2003).
17. NEUHAUSEN, S. L. Evaluation of restriction fragment length polymorphisms in *Cucumis melo*. *Theor Appl Genet* 83:379-384, (1992).

18. NG, T. J. New opportunities in the Cucurbitaceae. In: Janick J, Simon JE (eds), *New Crops*, Wiley, NY, USA, pp 538-546, (1993).
19. PERL-TREVES, R., ZAMIR, D., NAVOT, N., GALUN, E. Phylogeny of *Cucumis* based on isozyme variability and its comparison with plastome phylogeny. *Theor Appl Genet* 71:430-436, (1985).
20. PITRAT, M., CHAUVET, M., FOURY, C. Diversity, history and production of cultivated cucurbits. *Acta Hort* 492:21-28, (1999).
21. ROBINSON, R. W., DECKER-WALTERS, D. S. *Cucurbits*, CAB International, NY, (1997).
22. STAUB, J. E., SERQUEN, F. C., MCCREIGHT, J. D. Genetic diversity in cucumber (*Cucumis sativus* L.): III. An evaluation of Indian germplasm. *Genetic Res Crop Evol* 44:315-326, (1997A).
23. STAUB, J. E., BOX, J., MEGLIC, V., HORESJSI, T., MCCREIGHT, J. D. Comparison of isozyme and random amplified polymorphic DNA for determining intraspecific variation in *Cucumis*. *Gen Res Crop Evol* 44:257-269, (1997B)
24. STAUB, J. E., SERQUEN, F. C., HORESJSI, T., CHEN, J. F. Genetic diversity in cucumber (*Cucumis sativus* L.): IV: an evaluation of Chinese germplasm. *Genetic Res Crop Evol* 46:297-310, (1999).
25. STAUB, J. E., LOPEZ-SESE, A. I., FANOURAKIS, N. Diversity among melon landraces (*Cucumis melo* L.) from Greece and their genetic relationships with other melon germplasm of diverse origins. *Euphytica* 136:151-166, (2004).
26. STAUB, J. E., CHUNG, S. M., FAZIO, G. Conformity and genetic relatedness estimation in crop species having a narrow genetic base: the case of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Breeding* 124:44-53, (2005).

**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

<b>Proje No:</b> 106O170
<b>Proje Başlığı:</b> Ulusal Kavun ( <i>Cucumis melo</i> ) Koleksiyonlardaki Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> Doç. Dr. Anne Frary, Doç. Dr. Sami Doğanlar, Doç. Dr. Tuncer Taşkın, Dr. Ayfer Tan, Abdullah İnal, Sevgi Mutlu
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji & Genetik Bölümü, Urla, İzmir 35430
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:</b>
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b> 01/06/2006 - 01/06/2009
<b>Öz (en çok 70 kelime)</b> Genetik kaynakların yok olmadan gen bankalarında muhafaza altına alınması ve karakterizasyonu bir ülkenin sürdürülebilir tarımı için son derece önemlidir. <i>Cucumis</i> türleri için Türkiye birinci dereceden orijin merkezi olmamasına rağmen ülkede yetiştirilmiş veya yetiştirilmekte olan çeşitlerde (yerel, kültür çeşitleri) son derece büyük boyutlarda morfolojik çeşitliliğe rastlanmaktadır. Morfolojik düzeyde görülen çeşitliliğin genetik (yapısal) esaslarının belirlenmesi ise bu çalışmanın esas konusunu oluşturmuştur. Bu amaçla kavun ( <i>Cucumis melo</i> ) türüne ait yaklaşık 250 tohum örneğinde morfolojik ve SSR ve AFLP markörleri kullanılarak genetik olarak karakterizasyon yapılmıştır.
<b>Anahtar Kelimeler:</b> <i>Cucumis melo</i> , Genetik çeşitlilik, Çekirdek Koleksiyonlar, SSR, AFLP
<b>Projeden Yapılan Yayınlar:</b>