

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOMATESTE (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.) BAZI HASTALIK VE
ZARARLILARIN TEŞHİSİ İÇİN MOLEKÜLER TANI KİTLERİNİN
OLUŞTURULMASI**

Fitnet YILDIZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

2010

**DOMATESTE (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.) BAZI HASTALIK VE
ZARARLILARIN TEŞHİSİ İÇİN MOLEKÜLER TANI KİTLERİNİN
OLUŞTURULMASI**

Fitnet YILDIZ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez, 2009.02.0121.017 no' lu proje numarası ile Akdeniz Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.**

Haziran 2010

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOMATESTE (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.) BAZI HASTALIK VE
ZARARLILARIN TEŞHİSİ İÇİN MOLEKÜLER TANI KİTLERİNİN
OLUŞTURULMASI**

Fitnet YILDIZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu tez 08.06.2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından 100 (yüz) puan takdir edilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. A. Naci ONUS (Danışman)

Prof. Dr. Kenan TURGUT

Doç. Dr. Ersin POLAT

ÖZET

DOMATESTE (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.) BAZI HASTALIK VE ZARARLILARIN TEŞHİSİ İÇİN MOLEKÜLER TANI KİTLERİNİN OLUŞTURULMASI

Fitnet YILDIZ

Yüksek Lisans Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. A. Naci ONUS

Mayıs 2010, 82 Sayfa

Ülkemizde olduğu gibi tüm dünyada önemli bir sebze olan domatesin (*S. lycopersicum*) üretimi birçok bakteri, fungus, virüs ve nematod hastalıklarından olumsuz yönde etkilenmektedir.

Domates üretimini olumsuz etkileyen bakteriyel hastalıkların başında bakteriyel kanser (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), bakteriyel benek (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*), bakteriyel solgunluk (*Ralstonia solanacearum*) ve bakteriyel leke (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) gelmektedir.

Yaygın olan domates fungal hastalıkları içerisinde alternaria dal kanseri (*Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici*), yaprak küfü (*Cladosporium fulvum*), fusarium solgunluğu (*Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*), külleme (*Oidium lycopersicum*), geç yanıklık (*Phytophthora infestans*), gümüşi yaprak lekesi (*Stemphylium lycopersici*), mantari kök çürüklüğü (*Pyrenochaeta lycopersici*) ve verticillium solgunluğu (*Verticillium dahliae*) ilk sıralarda yer almaktadır.

Domateste bakteri ve fungus kaynaklı hastalıkların yanı sıra önemli verim kayıplarına neden virüs kaynaklı hastalıklarda mevcuttur. Domateste görülen önemli virüs hastalıkları arasında sarı yaprak kıvrıcıklığı virüsü (TYLCV), domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV), domates mozaik virüsü (TMV), hıyar mozaik virüsü (CMV) ve patates Y virüsü (PVY) bulunmaktadır. Domates üretimini olumsuz yönde etkileyen zararlıların başında ise kök-ur nematodları gelmektedir.

Hastalık ve zararlılara karşı yapılan mücadelede yaygın olarak kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Ancak kimyasal mücadelenin çevre ve insan sağlığına büyük zararları olduğu bilinmektedir. Bu durum hastalık ve zararlılara karşı uygulanacak mücadelede genetik dayanıklılığı en etkin yol olduğunu göstermektedir. Moleküler markırlar, içinde domatesinde bulunduğu birçok kültür bitkisinde bakteri, fungus, virüs ve kök uru nematoduna dayanıklı lokusların belirlenmesinde etkin olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışma ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Kısm Uzunluk Polimorfizmi (PCR-RFLP) olarak da bilinen Çoğaltılarak Kesilmiş Polimorfik Sekans Polimorfizmi (CAPS) ve Sekansı Karakterize Edilmiş Alanlar (SCAR) markırları kullanılarak kök-ur nematodu (*Meloidogyne*), fusarium solgunluğu [*Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (Sacc.) Snyder ve Hansen], domates mozaik virüsü (ToMV), domates sarı yaprak kıvrıcıklığı virüsü (TYLCV), verticillium solgunluğu (*Verticillium dahliae*), patates Y virüsü (PVY), mantari kök çürüklüğü [*Pyrenochaeta lycopersici* (Schneider and Gerlach)], külleme (*Oidium lycopersicum*] ve domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV) hastalıklarına karşı dayanıklılık lokuslarının teşhisinde kullanılabilen multipleks (çoklu), singlepleks (teksele) tanı kitleri geliştirilmiştir. Bu dayanıklılık özelliklerine ek olarak asit fosfotaz -1 (*Aps-1*) ve beta karoten (*B*) lokuslarının belirlenmesinde kullanılabilen kitler de geliştirilmiştir.

Çalışma kapsamında geliştirilmiş olan bu tanı ve teşhis kitleri bir taraftan ıslah programlarında markır yardımıyla seleksiyon çalışmalarında kullanılabilen gibi diğer taraftan hat ve çeşit karışımlarının tespitinde de kullanılacaktır. Kitlerin kullanımı ile araştırmacıların daha kısa sürede ve düşük maliyetli analiz yapabilmelerine olanak sağlanacaktır.

ANAHTAR KELİMELER: Domates, Hastalık Tanısı, Markır Yardımıyla Seleksiyon Multipleks-PZR

Jüri: Prof. Dr. A. Naci ONUS (Danışman)
Prof. Dr. Kenan TURGUT
Doç. Dr. Ersin POLAT

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF MOLECULAR DIAGNOSTIC KITS FOR DIAGNOSIS OF SOME DISEASES AND PESTS IN TOMATO (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.)

Fitnet YILDIZ

M.Sc. Thesis, Department of Horticulture

Adviser: Prof. Dr. A. Naci ONUS

May 2010, 82 pages

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is an important cultivated plant grown in many parts of the world. However production of tomato in the world and in our country suffers from many bacterial, fungal viral and nematode diseases. Bacteria diseases include bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), bacterial speck (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*), bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) and bacterial spot (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*).

Common tomato fungal diseases are alternaria stem canker (*Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici*), leaf mold (*Cladosporium fulvum*), fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*), powdery mildew (*Oidium lycopersicum*), late blight (*Phytophthora infestans*), gray leaf spot (*Stemphylium lycopersici*), corky root rot (*Pyrenochaeta lycopersici*) and verticillium wilt (*Verticillium dahliae*).

Viral diseases include Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV), Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV), Tomato Mosaic Virus (TMV), Cucumber Mosaic Virus (CMV) and Potato Virus Y (PVY). Several species of *Meloidogyne* produce root-knot nematode disease in tomato.

Molecular markers have been used in identification of bacterial, fungal, viral and nematode resistance loci in many plant species including tomato. In the present study several Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) also know as Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) and

Sequence Characterized Amplified Region; (SCAR) markers were multiplexed or used as singleplex to develop identification kits for root-knot caused by three species of *Meloidogyne*, vascular wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) [Snyder and Hansen], tomato mosaic virus (ToMV), tomato yellow leaf curl disease (TYLCD), *Verticillium dahliae* Kleb., potatoes Y virus (PVY), corky root rot disease caused by *Pyrenochaeta lycopersici* (Schneider and Gerlach), *Cladosporium fulvum*, powdery mildew caused by *Oidium lycopersicum* and tomato spotted wilt virus, (TSWV).

In addition to these resistance traits, kits were also designed for identification of two quality traits; acid phosphatase-1 (*Aps-I*) and Beta-carotene (*B*). Several markers used in kits are co-dominant markers, which directly recognize the homozygote and heterozygotes in F₂ progeny, making the selection process for resistance traits more precise compared to phenotypic selection in segregating populations.

Therefore these kits developed in the present study will be very useful for selecting individuals with desired characters in marker assisted selection (MAS) program and identification of an individual in mixtures of seedlings.

KEYWORDS: Disease Diagnosis, Marker Assisted Selection, Multiplex-PCR, Tomato

Committee: Prof. Dr. A. Naci ONUS (Adviser)

Prof. Dr. Kenan TURGUT

Assoc. Prof. Dr. Ersin POLAT

ÖNSÖZ

Önemli kültür bitkilerinden olan domates üretimi günümüzde yüzlerce mikro-organizmanın neden olduğu hastalıklar nedeniyle tehdit altındadır. Domateste dayanıklı hatların kullanılması önemli ekonomik kayıplara neden olan hastalık ve zararlıların yayılmasını önlemek için son derece önemlidir. Hastalık ve zararlılara dayanıklı hat veya çeşitlerin teşhisi her geçen gün artan uluslararası ticaretin ve yeni oluşan hastalık ve zararlıların varlığıyla giderek daha da önem kazanmaktadır. Günümüzde her geçen gün yeni teknikler geliştirilmekle birlikte bu tekniklerin hemen hemen hepsi dış kaynaklı olup yüksek maliyet gerektirmektedir. Maliyeti düşürmenin alternatif yöntemi ise var olan tekniklerin etkin bir şekilde kullanılmasıdır. Bu tez kapsamında markır destekli seleksiyon çalışmalarında, çeşit ve hat ayırımında etkin bir şekilde kullanılacak düşük maliyetli markır set sistemleri oluşturulmuştur.

Bu kitlelerin kullanılmasıyla domates ıslahında dayanıklı ve seçkin çeşitlerin geliştirilmesinde hızlı ve düşük maliyetli tekniklerin kullanıldığı markır destekli yöntemlerin bitki ıslahında kullanılmasıyla katkılar sağlanabilecektir. Ulusal tohumculuk sektörümüz çalışmada geliştirilen kitleleri kullanarak daha etkin ve güvenilir hat ve çeşitlerin geliştirilmesinde kullanabileceklerdir.

Bu tez çalışmasında yardım ve desteklerinden dolayı Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü öğretim üyesi Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. A. Naci ONUS'a, her konuda yardımları ve desteği ile hep yanımda olan Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Mehmet KARACA'ya ve tezin tüm aşamalarında yardımını esirgemeyen Sayın Dr. Ayşe Gül İNCE'ye en içten teşekkürlerimi sunarım. Değerli katkıları için jüri üyelerim Sayın Prof. Dr. Kenan TURGUT (Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü) ve Sayın Doç. Dr. Ersin POLAT'a (Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü) teşekkür ederim.

Bu güne kadar her türlü maddi manevi desteğiyle hep yanımda olan canım annem Hatun YILDIZ, babam İsmail YILDIZ ve kardeşlerime desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI	9
3. MATERYAL ve METOT.....	37
3.1. Bitki Materyali	37
3.2. DNA Ekstraksiyonu	37
3.2.1. Ekstraksiyon çözeltisi (EB).....	37
3.2.2. Lezyon çözeltisi (LB).....	38
3.2.3. DNA ekstraksiyon protokolü	38
3.3. DNA Kalitesi ve Miktarının Belirlenmesi	40
3.3.1. Spektrofotometrik yöntem.....	40
3.3.2. Agaroz jel elektroforez yöntemi.....	40
3.4. Hastalık Dayanıklılık Teşhis ve Kalite Özellikleri Kitlerinin Geliştirilmesi	41
3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR).....	41

3.6. SCAR Markırlarının Oluşturulması	44
3.7. CAPS Markırlarının Oluşturulması.....	45
4. BULGULAR ve TARTIşMA.....	46
4.1. Bitki Materyali	46
4.2. DNA Ekstraksiyonu	46
4.3. Spektrofotometrik Yöntemle DNA Kalite ve Miktarının Belirlenmesi	48
4.4. Agaroz Jel Elektroforez yöntemi.....	50
4.6. Lokusların PZR Profillerinin Belirlenmesi	51
4.7. Lokusların Uygun PZR Profillerinin Teyit Edilmesi	54
4.8. Multipleks Tanı Kitlerinin Geliştirilmesi.....	63
4.8.1. Multipleks CAPS tanı kitlerinin oluşturulması	64
4.8.2. Multipleks SCAR tanı kitlerinin oluşturulması.....	67
5. SONUÇ	71
6. KAYNAKLAR.....	74
ÖZGEÇMİş	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

A	Absorbans
cM	Santimorgan (harita birimi)
cm	Santimetre
°C	Santigrat derece
F ₁	Hibrit
g	Gram
kb	Kilobaz
kg	Kilogram
M	Molarite
m	Metre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolarite
mm	Milimetre
nm	Nanometre
mmol	Milimol
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum Sülfat
pH	Potentia hydrogeny
V	Volt
v/v	Hacim/hacim
w/v	Ağırlık/hacim
ε	Varoluş katsayısı
%	Yüzde
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre

Kısaltmalar

AFLP	‘Amplified Fragment Length Polymorphism’
AJE	Agaroz Jel Elektroforesiz
BME	‘ β -mercaptoethanol’
BTSAP	Basit Tekrarlı Sekanslar Arası Polimorfizmi
BTSP	Mikrosatelit veya Basit Tekrar Sekansları Polimorfizmi
CAPS	‘Cleaved Amplified Polymorphic Sequence’
CIA	Kloroform İzoamil Alkol
CTAB	‘Cetyl Tri-Methyl ammonium Bromide’
ÇKPS	Çoğaltılarak Kesilmiş Polimorfik Sekans Polimorfizmi
ÇKUP	Çoğaltılmış Kısım Uzunluk Polimorfizmi
DAMD	‘Directed Amplification of Minisatellite DNA’
DNA	‘Deoxyribonucleic Acid’ (Deoksiribonükleik Asit)
dNTP	‘Deoxyribonucleotide triphosphate’
DSA	Doğrudan Sekans Analizleri (‘Direct Sequencing’)
EB	Ekstraksiyon çözeltisi
EDTA	‘Ethylenediaminetetraaceticacid’
ISSR	‘Inter-Simple Sequence Repeat’
LB	Lezyon çözeltisi
LiCl	‘Lithium chloride’
MA	Moleküler ağırlık
MgCl ₂	Magnezyum klorür
NaCl	Sodyum Klorür
NaOAc	Sodyum Asetat
NIR	‘Near Isogenic Lines’
PCR-RFLP	‘Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism’
PVPP	‘Polyvinylpolypyrrolidone, Insoluble’
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PZR-SKUP	Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Kısım Uzunluk Polimorfizmi
RAPD	‘Random Amplified Polymorphic DNA’
RÇDP	Rastlantısal Çoğaltılmış DNA Polimorfizmi

RFLP	‘Restriction Fragment Length Polymorphism’
RNA	‘Ribonucleic Acid’ (Ribonükleik Asit)
SCAR	‘Sequence Characterized Amplified Region’
SF	Seyreltme Faktörü
SKEA	Sekansı Karakterize Edilmiş Alanlar
SKUP	Sınırlandırılmış Kısm Uzunluk Polimorfizmi
SLS	Sodyum Laruil Sarkosil
SNP	‘Single Nucleotid Polymorphism’
SSCP	‘Single Stranded Conformational Polymorphism’
Ta	Amplifikasyon sıcaklığı (‘Annealing Temperature’)
TBE	TRIS-Borate EDTA
TE	TRIS-EDTA
Tm	‘Melting Temperature’ (Erime sıcaklığı)
TNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
ToMV	‘Tomato mosaic virus’ (Domates Mozaik Virüsü)
TRIS	‘Tris (hydroxymethyl) aminomethane’
Triton X-100	‘Octyl phenol ethoxylate’
TSUP	Tek Sarmallı Uygunluk Polimorfizmi
Tween-20	‘Polyoxyethylene sorbitan monolaurate’
TSWV	‘Tomato spotted wilt virus’ (Domates lekeli solgunluk virüsü)
TYLCD	‘Tomato yellow leaf curl disease’ (Domates sarı yaprak kıvrıcıklığı virüsü)
UV	Ultraviyole
YMDÇ	Minisatellite veya Yönlendirilmiş Minisatellitli DNA Çoğaltımı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Domates çiçek kısımları ve morfolojisi	13
Şekil 2.2. Domateste farklı meyve tipleri ve meyve renkleri.....	13
Şekil 2.3. Domates sarı yaprak kıvrıkcık virüsü zararı	16
Şekil 2.4. Domateste kök-ur nematodu.	17
Şekil 2.5. Domateste mantari kök çürüklüğü	19
Şekil 2.6. Domates mozaik virüsü.....	21
Şekil 2.7. Domateste <i>Verticillium</i> solgunluğu.....	23
Şekil 2.8. Domateste külleme hastalığı	25
Şekil 2.9. Domateste fusarium solgunluğu hastalığı	27
Şekil 2.10. Domateste yaprak küfü.	28
Şekil 2.11. Domates lekeli solgunluk virüs hastalığı	29
Şekil 4.1. Bitkilerden DNA izolasyonu ve agaroz jel elektroforesis çalışmaları.....	47
Şekil 4.2. Genomik DNA'lar ve bu DNA'ların PZR çalışmasının agaroz jel elektroforesiz yöntemi ile teyidi	50
Şekil 4.3. PZR profili A ile çoğaltılan lokuslar.....	51
Şekil 4.4. PZR profili B ile çoğaltılan lokuslar	52
Şekil 4.5. PZR profili C ile çoğaltılan lokuslar	53
Şekil 4.6. <i>Oidium lycopersicum</i> allelleri için uygun PZR profilinde lokusların teyit edilmesi	55

Şekil 4.7. Domates mozaik virüsü (ToMV) allelleri için uygun PZR profilinde lokusların teyit edilmesi.....	56
Şekil 4.8. BK_FR1, APS1_FR1, BK_FR2, CR_FR, ToMV_FR, Fus_FR2, REX_FR, C8B_FR, TMV_FR6, FLUV_FR, FUS_FR, FUS_FR1 allelleri için uygun PZR profilinde lokusların teyit edilmesi.....	57
Şekil 4.9. <i>Meloidogyne incognita</i> dayanıklılık testi (REX_FR-Taq 1).....	58
Şekil 4.10. TY1_FR primer çifti ile hat ve çeşitlerin taranması	59
Şekil 4.11. <i>B</i> , <i>Aps-1</i> ve <i>Ve</i> lokuslarının restriksiyon enzimleri ile taranması	61
Şekil 4.12. <i>Cladosporium fulvum</i> (<i>Cf</i> geni) lokusuna ait SCAR markırının CAPS markırına dönüştürülmesi	63
Şekil 4.13. MK-N-TYLC-BK test kiti agaroz jel elektroforesis	65
Şekil 4.14. <i>Oidium lycopersicum</i> teşhis kiti	67
Şekil 4.15. SCAR-Ol-Fus-C8B-TMV test kiti agaroz jel elektroforesis.....	69
Şekil 4.16. <i>I2</i> lokusunun taranması	70

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. 2007 yılı dünya sofralık domates üretimi ve ilk 10 ülke sıralaması	3
Çizelge 1.2. Dünya domates ihracatında yer alan başlıca ülkeler ve ihracat miktarları (2007).....	3
Çizelge 1.3. Dünya domates ithalatında önemli ülkeler ve ithalat payları (2007).....	4
Çizelge 1.4. Domateste yaygın olarak bulunan bazı hastalık ve zararlılar	5
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan primer çiftleri	41
Çizelge 3.2. PZR Profil A	43
Çizelge 3.3. PZR Profil B.....	43
Çizelge 3.4. PZR Profil C.....	44
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan hibrit çeşitler ve özellikleri.....	46
Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan domateslere ait genomik DNA'ların spektrofotometrik ölçüm değerleri.....	49
Çizelge 4.3. Çalışmada geliştirilen kitlerle tanısı yapılabilecek lokuslar	64
Çizelge 4.4. Çalışmada kullanılan SCAR lokus kombinasyonları.....	68

1. GİRİŞ

Günümüzde 7 milyara yaklaşan dünya nüfusunun yirmi yıl sonra 9 milyara ulaşacağı tahmin edilmektedir. Dünya nüfusunun artmasına paralel olarak bitkisel üretimin de artırılması temel zorunluluktur. Ancak besin kaynaklarının günümüze kadar olan gelişimi incelendiğinde bitkisel üretimde elde edilebilecek artışın nüfusa paralel olarak artmasının mümkün olamayacağı ve dünyada var olan mevcut gıda sıkıntısının daha da büyüebileceği öngörülmektedir.

Günümüze değin değişik yöntemlerle geliştirilen verimli ve kaliteli çeşitlerin kullanımıyla birlikte sulama, gübreleme, hastalık ve zararlılarla mücadele gibi kültürel işlemlerin uygulanmasıyla (Yeşil Devrim) birim alandan daha yüksek verim ve daha kaliteli ürün elde edilmesini sağlamıştır. Buna karşın mevcut tarım alanlarının yerleşime açılması, tarımda kullanılabilir yeni verimli alanlarının yok denecek kadar az olması ve küresel ısınma nedeniyle değişen biyotik ve abiyotik çevresel koşullar gibi sebeplerden dolayı artan nüfus oranına cevap verilebilecek ürün artışının sağlanmasının mümkün olmayacağını göstermektedir.

Temel besin maddelerinin üretimini sınırlayan olumsuz etkileri ortadan kaldırmak ve üretimi en üst düzeye ulaştırmak için üzerinde önemle durulması gereken konuların başında bitki ıslahı gelmektedir. Tarımsal üretimde kullanılacak olan genetik materyalin oluşturulmasında, klasik ıslah yöntemleri günümüze değin ağırlıklı olarak kullanılmıştır. Bu yöntemler bitkilerde verim ve kalitenin artırılması için kullanılarak insanların beslenme ve giyinme ile ilgili gereksinimleri karşılanmıştır. Ancak klasik bitki ıslah yöntemleri ile günümüze kadar sağlanan tarımsal üretim artışı ile hızla artan nüfus karşısında ihtiyaç duyulan ürün miktarını karşılamamanın ve istenilen bütün özelliklerin bir genotipte toplanabilmesinin pek de mümkün olmayacağı düşünülmektedir.

Kültür bitkilerinin verimini arttırmak, ürün kalitesini düzeltmek, uygun olmayan şartlara dayanıklılık veya tolerans kazandırmak, hastalıklar ve zararlılar nedeniyle ortaya çıkan ürün kayıplarını azaltmak için klasik ıslah yöntemlerinin desteklenmesi

amacıyla biyoteknoloji ve moleküler biyoloji gibi yeni teknolojilerin tarımda ve özellikle bitki ıslahında kullanılması gerekmektedir.

Klasik bitki ıslahı metotları ile yeni çeşit ve hatların geliştirilmesinin çok uzun zaman alması, kültür bitkilerine aktarılmak istenilen gen/genlerin her zaman aktarılamaması tüm türler için kullanılamaması ancak akraba türler arasında yapılan çalışmalardan ümit var sonuçlar alınması gibi zorluklar klasik bitki ıslahının doğasında mevcuttur. Buna karşılık genetik mühendisliği ile birlikte kullanılan modern teknolojiler sayesinde bitkiler aleminde olmasa bile hayvanlarda veya diğer mikroorganizmalarda bulunan veya yapay olarak elde edilen genler belirlenerek bitkilere aktarılmakta ve yeni özelliklere sahip çeşitlerin geliştirilebilmesine imkan sağlanmaktadır.

İnsan beslenmesinde kullanılacak yaklaşık 5.000 bitki türünden 1.500'nün tarımı yapılmaktadır (Swaminathan 1993). Bu türlerden 250'sine dahil olan yaklaşık 250.000 çeşit insanların besin gereksinimlerinin büyük bir kısmını karşılamaktadır (Wilkes 1993). İçerdiği çeşitli mineral ve vitaminler ile insan sağlığı için yararlı gıda maddelerinden olan domates ve domates ürünlerinin son yıllarda tüketimdeki payı ortalama artmaktadır.

Avrupa, Amerika ve diğer gelişmiş ülkeler tüketimin en fazla olduğu ülkeler olup tüketimleri sabit bir büyüme göstermektedir. Rusya, Çin, Hindistan ile Afrika gibi gelişmekte olan ülkelerde ise kişi başı tüketim düşük olmakla birlikte hızlı bir şekilde artmaktadır. Orta Doğu'da 1997 yılında 6.2 kg olan kişi başı tüketim 2007 yılında 10.8 kg'a yükselmiş ve toplam tüketim yıllık ortalama %13 oranında artmıştır. Son yıllarda Çin'de ise domates tüketimi ortalama %15 oranında arttığı bilinmektedir (Anonymous 2010).

Dünyada ve ülkemizde en fazla yetiştirilen sebze türlerinden biri olan domates 2007 yılında yaklaşık olarak 126 milyon ton üretilmiştir. Üretimin yaklaşık %90'a yakın kısmı Kuzey Yarımküre'de temmuz-aralık aylarında ve %10'luk kısmı ise Güney Yarımküre'de ocak-haziran aylarında yapılmaktadır. Ülkemiz, 2007 yılı verilerine göre 9.919.000 ton ile dünya domates üretiminde 3. sırada yer almaktadır (Çizelge 1.1). Dünyada 2007 yılı domates üretiminde ise 33.645.000 ton ile Çin ilk

sırada yer almakta ve bunu 11.500.000 ton ile ABD takip etmektedir (Anonymous 2010).

Çizelge 1.1. 2007 yılı dünya sofralık domates üretimi ve ilk 10 ülke sıralaması

Sıralama	Ülkeler	Üretim (ton)
1	Çin	33.645.000
2	Amerika	11.500.000
3	Türkiye	9.919.000
4	Hindistan	8.585.000
5	Mısır	7.550.000
6	İtalya	6.025.613
7	İran	5.000.000
8	İspanya	3.615.000
9	Brezilya	3.364.438
10	Meksika	2.900.000
Dünya Toplam		126.246.708

Dünya 2007 yılı sofralık domates ticaretine bakıldığında ise; sofralık domates ihracatı 5.6 milyon ton ve 6.5 milyar dolar değer olarak gerçekleşmiştir. Dünyada en büyük domates ihracatçısı Meksika olup bunu sırasıyla İspanya, Hollanda, Ürdün takip etmektedir (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2’de görüldüğü üzere dünya domates ihracatında Türkiye 5. sırada yer almakta ve ülkemizde yetiştiriciliği yapılan yaş sebzeler içerisinde en fazla ihracatı yapılan ürün domates olmaktadır (Anonymous 2010).

Çizelge 1.2. Dünya domates ihracatında yer alan başlıca ülkeler ve ihracat miktarları (2007)

Ülkeler	Miktar (Ton)	Fiyat (\$/ton)
1 Meksika	1.052.686	1.015
2 İspanya	884.244	1.334
3 Hollanda	842.027	1.827
4 Ürdün	386.968	453
5 Türkiye	370.613	799
6 Fas	297.593	685
7 Amerika	245.315	1.268
8 S. Arabistan	207.717	456
9 Belçika	202.772	1.461
10 Fransa	167.646	1.616
Dünya Toplam	5.683.925	1.108

Çizelge 1.3’de verildiği üzere 2007 yılı dünya domates ithalatında ise %18.66’lık pay ile Amerika ilk sırada, Almanya %17 ile ikinci sırada, İngiltere ise %11 ile üçüncü sırada yer almaktadır (Anonymous 2010).

Çizelge 1.3. Dünya domates ithalatında önemli ülkeler ve ithalat payları (2007)

Ülkeler	Değer (1.000\$)	Miktar (Ton)	İthalat Birim Fiyatı (\$/Ton)	Pay (%)
Amerika	1.283.017	1.070.807	1.198	18.66
Almanya	1.227.834	663.561	1.85	17.86
İngiltere	771.036	419.649	1.837	11.22
Fransa	582.690	495.007	1.117	8.48
Rusya	534.742	550.528	971	7.78
Hollanda	342.696	192.597	1.779	4.99
Kanada	267.082	196.529	1.359	3.89
İsveç	165.039	81.651	2.021	2.4
Belçika	132.376	74.405	1.779	1.93
Polonya	118.415	80.112	1.478	1.72

Ülkemizde 2008 yılında gerçekleştirilen toplam 21.476.323 ton sebze üretimi içerisinde 10.985.355 ton ile domates ilk sırada yer almaktadır. Domates ülkemizin hemen her bölgesinde yetiştirilmekle birlikte, sofralık tüketime yönelik üretim genellikle Akdeniz Bölgesinde örtü altında ve açıkta yapılmaktadır (Anonim 2008). Ülkemiz 2008 yılı toplam domates üretiminin 7.419.814 tonu olan sofralık domates üretiminin 3.294.901 tonu Akdeniz Bölgesinden sağlanmıştır. Akdeniz Bölgesinde yapılan bu üretimin ise 1.936.778 tonu Antalya’da üretilmiştir (Anonim 2009a).

Ülkemizde yetiştirilen domatesin %20’ si işleme endüstrisine gönderilmektedir. Endüstriye yönelik üretim ise genel olarak Marmara ve Ege Bölgelerinde, Balıkesir, Bursa, Manisa ve Çanakkale illerinde gerçekleştirilmektedir. Samsun, Muğla, İçel, Tokat, İzmir ve Konya diğer önemli üretim alanları olmakla birlikte ülkemizin hemen hemen tüm illerinde domates yetiştiriciliği yapılabilmektedir (Anonim 2009a).

Farklı iklim bölgelerine sahip ülkemizde yaz aylarında tarlada, kış aylarında ise cam ve plastik seralarda yetiştirilen domatesler sayesinde tüm yıl pazarda taze domates bulmak mümkündür. Dünya domates üretim rakamlarından da anlaşılacağı üzere ülkemiz de domates verimi dünya ortalamasının oldukça üzerindedir. Ancak üretimimiz Hollanda ile karşılaştırıldığında dekara verimimiz yaklaşık olarak 12 kat

daha az olduğu görülmektedir (Anonymous 2007). Hollanda'nın bu başarısı kültürel işlemlerin yanı sıra hastalık ve zararlılara dayanıklı hat ve çeşitlerin kullanılması ve bu konuda yoğun çalışmaların yapılmasıdır.

Serada yapılan yetiştiricilik artıkça gerekli kültürel işlemlerin tam uygulanmaması, her yıl aynı bitkinin yetiştirilmesi, hastalıklı bitki artıklarının üretim alanından uzaklaştırılmaması, seraların iyi havalandırılmaması gibi nedenlerden dolayı pek çok hastalık ortaya çıkmaktadır. Domateste fungal ve viral hastalık etmenlerinin yanı sıra pek çok bakteriyel etmen de önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır. Kaynak makalelerden derlenen domateste yaygın olarak üretim ve verim kaybına neden olan hastalık ve zararlılar etmenleri ile birlikte Çizelge 1.4'de verilmiştir.

Çizelge 1.4. Domateste yaygın olarak bulunan bazı hastalık ve zararlılar

Hastalık/Zararlı	Mikroorganizma	Gen	Kaynak
Alternaria dal Kanseri	<i>Alternaria alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Asc	<i>S. lycopersicum</i>
Mantarımsı kök çürüklüğü	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	py-1	<i>S. hirsutum</i> <i>S. peruvianum</i>
Fusarium solgunluğu	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> race 0	I-1	<i>S. pimpinellifolium</i>
Fusarium solgunluğu	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> race 1	I-2	<i>S. pimpinellifolium</i>
Fusarium solgunluğu	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> race 2	I-3	<i>S. pennellii</i>
Fusarium baş ve kök çürüklüğü	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	Frl	<i>S. peruvianum</i>
Geç yanıklık	<i>Phytophthora infestans</i>	Ph-1 Ph-2 Ph-3	<i>S. pimpinellifolium</i>
Yaprak küfü	<i>Cladosporium fulvum</i> (<i>Fulvia fulva</i>)	Cf	<i>S. peruvianum</i> <i>S. pimpinellifolium</i>
Gümüşi yaprak lekesi	<i>Stemphylium lycopersici</i>	Sm	<i>S. pimpinellifolium</i>
Külleme	<i>Oidium lycopersicum</i>	Ol-1 Ol-2	<i>S. hirsutum</i> <i>S. habrochaites</i> <i>S. lycopersicum</i>
Külleme	<i>Leveillula taurica</i>	Lv	<i>S. chilense</i>
Verticillium solgunluğu	<i>Verticillium dahliae</i>	Ve	<i>S. lycopersicum</i> <i>S. pimpinellifolium</i>
Bacterial benek	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Pto	<i>S. pimpinellifolium</i>

Çizelge 1.4. Devamı

Hastalık/Zararlı	Mikroorganizma	Gen	Kaynak
Bakteriyel leke	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Bs-4</i>	<i>S. pennellii</i>
Domates mozaik virüsü	Tomato mosaic virus (ToMV)	<i>Tm-1</i> <i>Tm-2</i> <i>Tm2²</i>	<i>S. hirsutum</i> <i>S. peruvianum</i> <i>S. peruvianum</i>
Domates lekeli solgunluk virüsü	Tomato spotted wilt virus (TSWV)	<i>Sw-5</i>	<i>S. peruvianum</i>
Domates sarı yaprak kıvrıkcılığı virüsü	Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)	<i>Tylc</i> <i>Ty-1</i> <i>Ty-2</i>	<i>S. pimpinellifolium</i> <i>S. chilense</i> <i>S. habrochaites</i>
Kök-ur nematodu	<i>Meloidogyne arenaria</i>	<i>Ma</i>	<i>S. peruvianum</i>
Kök-ur nematodu	<i>Meloidogyne incognita</i>	<i>Mi</i>	<i>S. peruvianum</i>
Kök-ur nematodu	<i>Meloidogyne javanica</i>	<i>Mj</i>	<i>S. peruvianum</i>
Alfalfa mozaik virüsü	Alfalfa mosaicvirus (AMV)	<i>Am</i>	<i>S. hirsutum</i>
Patates Y virüsü	Potato virus Y (PVY)	<i>Pot-1</i>	<i>S. habrochaites</i>

Ülkemizde yetiştirilen kültür bitkilerinde ekonomik olarak zarara neden olan toplam 430 hastalık, zararlı ve yabancı ot bulunmaktadır. Bunlardan 275'ini böcekler 85'ini hastalık etmenleri 70'ini de yabancı otlar oluşturmaktadır. Bunlarla gerekli mücadele çalışmaları yapılmadığında ürün kaybı ortalama %35 dolaylarında olmaktadır (Anonim 2009b). Bu kayıplar kültür bitkisindeki zararının tür ve yoğunluğuna bağlı olarak bazen %100'lere ulaşabilmesi mümkündür. Bitkisel üretimde ekonomik yönden oldukça büyük rakamlara ulaşan bu kayıpların önlenmesi ve biyolojik dengenin korunarak sürdürülebilir tarım için tarımsal üretim tekniklerine uygun olarak yapılması zorunluluk haline gelmiştir.

Bitkisel üretimi kısıtlayan en önemli etmenlerin başında patojenik mikroorganizmalar gelmekte ve dünya genelinde üretimi genel olarak tehdit etmektedir. Tarımsal üretimin yoğunlaşması ile üreticiler, ürünlerini korumak amacı ile tarımsal kimyasalları sürekli olarak yüksek oranlarda kullanmaya başlamışlardır. Ancak kimyasalların (pestisit, fungusit, herbisit, bitki büyüme düzenleyiciler ve hormonlar) çevreye verdikleri zararların yanı sıra bitkilerde kalıntı bırakması,

patojenlerin zamanla dayanıklılık kazanmaları gibi pek çok problem de kimyasal kullanımının sınırlayıcı yönleri olarak ortaya çıkmaktadır.

Biyolojik mücadele yöntemi hastalık ve zararlılarla mücadelede tarımsal kimyasallara alternatif bir yöntem olabilmektedir. Biyolojik mücadele olarak günümüzde özellikle kök hastalıklarına karşı mücadelede rizobakteriler kullanılmakta ve bunlar bitki büyüme düzenleyici rizobakteriler olarak adlandırılmaktadır. Bu bakteriler ile bitki patojenleri aralarında yaşam alanı ve besin maddeleri için rekabet etmesiyle patojenlerinin zararları azaltılabilmektedir (Compant vd 2005). Ancak rizobakterilerin biyolojik mücadelede kullanılmasının gelecekte diğer bazı sorunlara yol açabileceğinin yanında etkin mekanizmanın tam olarak bilinmemesi nedeniyle günümüzde pratiğe tam olarak aktarılamamaktadır.

Bitkiler genellikle patojen saldırılarına karşı doğal (genetik) bir savunma mekanizmasına sahiptir. Patojen saldırısından önce bitki çeşitli şekillerde uyarılarak (alkaloit, sinyal transitörler vb) savunma mekanizmasını başlatmakta ve oluşturduğu fiziksel ve biyokimyasal etmenlerle hastalık oluşumunu azaltabilmekte veya engelleyebilmektedir. Gerek fiziksel (örneğin yaprak şekli veya büyüme habitü) gerekse biyokimyasal (enzim veya fenolik bileşiklerin üretilmesi) olarak genler tarafından kontrol edilmekte ve dolayısıyla genotipte bulunan dayanıklılığı temsil etmektedir (Compant vd 2005).

Günümüzde yaygın olarak kullanılmakta olan kimyasal mücadele gerek çevreye gerekse insan sağlığına olan olumsuz etkilerinden dolayı tercih edilmemeli veya metil bromit örneğinde olduğu gibi çevre ve insan sağlığı açısından tehlikeli olan kimyasalların kullanımı yasaklanmalıdır. Genetik dayanıklılık etkin mücadelede bir taraftan basitliği diğer taraftan etkinliği nedeniyle tercih edilmektedir. Genetik dayanıklılığın moleküler teknikler kullanılarak belirlenmesi her geçen gün yaygınlaşmaktadır. Moleküler tekniklerden DNA markırları (belirteçleri) basitliği, ekonomik olması ve doğruluğu (güvenilirliği) nedeni ile diğer moleküler tekniklere oranla avantajlara sahiptir. DNA markırları genetik dayanıklılığın belirlenmesinde ve çeşitlere aktarılmasının (Markır Yardımıyla Seleksiyon) yanında tür veya çeşitler arasındaki farklılıkların belirlenmesinde, gıda maddelerinin içeriklerinin tespitinde ve

cinsiyet ayrımında da yaygın olarak kullanılmaktadır (Dax vd 1998, Doğanlar vd 1998, Kawchuk vd 1998, Huang vd 2000, Ohmori vd 2000, İnce vd 2010b).

Hızlı ve düşük maliyetli tekniklerin kullanıldığı markır destekli yöntemlerin bitki ıslahında kullanılması oldukça önemlidir. Günümüzde yeni teknikler geliştirilmekle birlikte bu tekniklerin hemen hemen hepsi dış kaynaklı olup yüksek maliyet gerektirmektedir. Maliyeti düşürmenin alternatif yöntemi ise var olan tekniklerin etkin bir şekilde kullanılmasıdır. Bu tez kapsamında markır destekli seleksiyon çalışmalarında, çeşit ve hat ayrımında, hastalıklara ve zararlılara dayanıklı, kaliteli çeşitlerin geliştirilmesinde kullanılabilir düşük maliyetli markır sistemleri oluşturulması amaçlanmıştır.

Oluşturulan bu hastalık ve zararlı teşhis veya tanı kitleri diğer bitkilerde de benzer çalışmaların oluşturulmasına katkı sağlayabilecektir. Domateste var olan ve ekonomik kayıplara neden olan hastalık ve zararlıların başta biber, patlıcan olmak üzere diğer sebzelerde de var olduğundan benzer yaklaşımlarla bu sebzelerde de kullanımını teşvik edecektir. Tez çalışmasında oluşturulan bu tanı kitlerinin hastalık ve zararlılara dayanıklı ve kaliteli çeşitlerin geliştirilmesinde kullanımı ulusal tohumculuk faaliyetlerine katkılar sağlayabilecektir.

2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

Solanum lycopersicum L. eski adı veya sinonim isimleri *Lycopersicon lycopersicum* L. veya *Lycopersicon esculentum* L. olan domates aralarında tütün, patates, patlıcan, biber ve güzelavratotunun da bulunduğu *Solanaceae* familyasına dahil olan ve diploid genomunda 24 kromozomu bulunan önemli bir kültür bitkisidir. Domatesin anavatanı Orta ve Güney Amerika olup kültüre alınması Peru kıyılarında başladığı ve buradan özellikle İspanyol koloniler aracılığıyla dünyaya yayıldığı düşünülmektedir (Günay 1992). Avrupa'da domates ilk kez 1554 yılında İtalya da bilinmeye başlamıştır. Domatesin Anadolu'ya ne zaman girdiğine ilişkin belgeler bulunmamakla birlikte Bayraktar (1973), domatesin 1900'lü yıllarda ilk kez Adana'ya getirildiğini ve ilk yıllarda 'Frenk patlıcanı' olarak adlandırıldığını belirtmektedir. Bu yıllarda Fransızların Adana ve civarında etkili olduğu düşünüldüğünde domatesin ülkemize Fransa'dan gelmiş olabileceği düşünülebilir.

Domates *Solanaceae* familyasının *Solanum* cinsi içinde yer almakta ve bu cins içinde yer alan türlerde meyveler genel olarak tüketim amacıyla kullanılmaktadır. Bazı türlerinin meyvelerinde tomatin ve solanin olması nedeniyle zehirlidir. *Solanum* cinsi içinde yer alan ve kültürü yapılan domatesler 1768 yılında Miller tarafından *Lycopersicon esculentum* Mill. olarak adlandırılmıştır. Daha sonra Linne (L.) domatesi *Solanum lycopersicum* L. olarak adlandırmıştır (Cobb 2008).

Miller tarafından yapılan bir sınıflandırmaya göre *Lycopersicon* cinsi içinde yer alan domatesler meyve renklerine göre iki alt cinse ayrılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre meyveleri kırmızı renkli domatesleri içinde toplayan alt cinse *Eulycopersicon*, yeşil ve beyaz domatesleri kapsayan alt cinsler ise *Eriolycopersicon* grubu altında toplanmıştır. *Eulycopersicon* alt cinsi içine giren önemli türleri *Solanum lycopersicum* ve *Solanum pimpinellifolium*'dur. *Eriolycopersicon* alt cinsi ise *Solanum hirsutum* ve *S. peruvianum* türlerini içermektedir (Miller 1768).

Domates çoğunlukla tek yıllık otsu bir bitki olmasına rağmen uygun ekolojik koşullarda bitki çok yıllık olarak da gelişebilmektedir. Domates tohumlarının çimlenmesi ile önce kazık bir kök meydana gelir. Kazık kök hızla gelişir ve 20 gün içinde 20 cm uzunluğa ulaşır. Kazık kök belli bir boya ulaştıktan sonra kökler

üzerinde saçak kökler, saçak kökler üzerinde de ince kılcal tüyler oluşur. Domateste köklerin %70'ine yakını toprağın 20-50 cm derinliğine kadar ulaşır. Çok az bir kısmı 50 cm'den derine gidebilmektedir. Bununla birlikte domatesin kurağa dayanıklı bir bitki olması nedeniyle kurak koşullarda köklerin 150 cm derine kadar ulaşabildiği gözlemlenmiştir (Günay 1992, Kaygısız ve Aybak 2004).

Domates otsu bir gövdeye sahip olup gövde başlangıçta yuvarlak, yumuşak ve üzeri tüylüdür. Bitki gelişimi ile birlikte gövde kesiti köşeli bir hal alır ve odunsu bir yapı kazanır. Bitki dallanmaya çok yatkın olup, gövde belirgin olmayan boğum ve boğum aralarından oluşmuştur. Yaprakların gövdeye bağlandığı yerden, koltuk denilen yeni sürgünler çıkar. Domates gövdesinin boylanması ile ilgili olarak sınırsız (indeterminate) büyüme gösterenler ve sınırlı (determinate) büyüme gösteren domatesler olmak üzere iki tip büyüme şekli görülür (Günay 1992, Kaygısız ve Aybak 2004).

Sınırsız büyüme gösteren domateslerde 4-5 boğum oluştuktan sonra ana büyüme ucunda değişim meydana gelerek çiçek salkımını oluşturur. Daha sonra büyüme ucu gelişmesine devam ederek yeni bir yaprak ve çiçek salkımından oluşan sürgünü oluşturur. Böylece büyüme sınırsız olarak devam eder. Bitki boyu 1 yıl içinde 10 m'nin üzerine çıkabilir. Koltuklardaki sürgünler budanarak, bitkiye gövde, yaprak ve çiçeklerden oluşan bir yapı kazandırılabilir (Günay 1992, Kaygısız ve Aybak 2004).

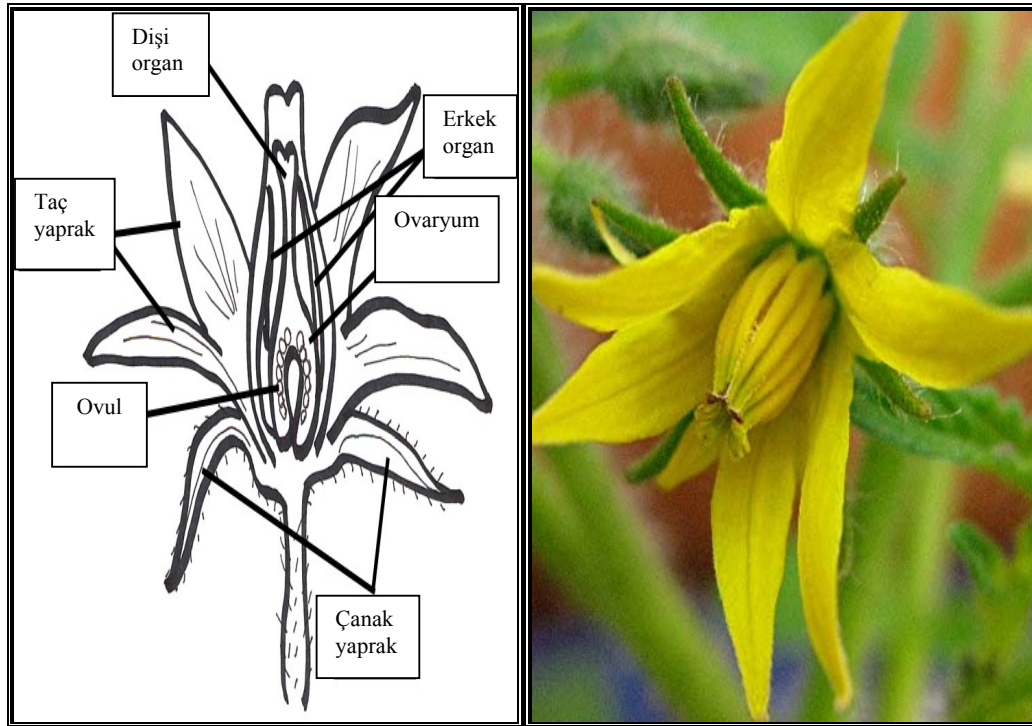
Sınırlı büyüme gösteren domateslerde ise ana büyüme ucu 2-4 yaprak oluşturduktan sonra çiçek tomurcuğu oluşur ve gelişme çiçek tomurcuğuyla son bulur. Çiçek sapı sayısı sınırlıdır. Bitki dik veya çalimsı formda gelişir. Bitki boyu genel olarak 40-60 cm arasında olup en fazla 2 m'ye kadar boylanabilmektedir (Günay 1992, Kaygısız ve Aybak 2004).

Domateste ana gövde üzerindeki büyüme ucu çiçeklenme dönemine kadar çeşitlere göre farklılık göstermekle birlikte 7-11 yaprak oluşturur. Erkenci çeşitlerde 2-3 yaprak sonra, geççi çeşitlerde 6-8 yaprak sonra çiçek tomurcuğu oluşur. Yapraklar 3-8 adet yaprakçığın birleşmesinden oluşan bileşik yapraktır. Yaprak uzunluğu genel olarak 10-50 cm arasında değişmektedir. Yaprakçık kenarları dişli ve üzeri tüyle kaplı olup alt yüzdeki tüylülük durumu daha fazladır. Domateslerde basit parçalı, patates,

buruşuk ve dar dilimli olmak üzere 4 tip yaprak şekline rastlanılır. Kültürü yapılan domateslerde daha çok parçalı yaprak şekli görülür (Günay 1992).

Bitkinin generatif döneme geçmesi ile birlikte büyüme ucunda farklılaşma meydana gelir ve yaprak taslaklarının yanında çiçek tomurcuğu taslakları da oluşmaya başlar. İlk çiçek salkımı 6-7. boğumdan sonra oluşur. İkinci çiçek salkımı, 1. çiçek salkımından sonraki boğumlarda meydana gelir. Çiçekler salkım şeklinde olup salkım şekli ve salkımdaki çiçek sayısı çeşitlere ve yetiştirilme koşullarına bağlı olarak değişiklik gösterir. Domates çiçek salkımlarında basit, basit çatal ve çift dallı olmak üzere 3 tip dallanmaya rastlanır (Günay 1992, Kaygısız ve Aybak 2004).

Çiçek salkımındaki çiçeklerden her biri erselik ve tam çiçektir. Domates çiçeklerinde 5 veya 6 adet erkek organ ve 1 adet 2-4 karpelli dişi organ bulunur (Şekil 2.1). Dişi organın tepesi yeşil ve tomurcuk şeklinde olup anter konisi içinden görülebilir. Erkek organların boyları dişi organla hemen hemen aynı boyda veya daha uzundur. *S. lycopersicum* ve *S. pimpinellifolium*'un dışındaki türlerde anterlerin boyu dişi organdan daha kısadır. Bu nedenle bu türlerde yabancı tozlanma belirgindir.



Şekil 2.1. Domates çiçek kısımları ve morfolojisi.

Kültür formlarında yabancı tozlanma oranı %2'dir. Bununla birlikte gerek düşük gerekse yüksek sıcaklıklarda dişi organın boyunun uzaması nedeniyle yabancı tozlanma oranı %35'e kadar çıkabilir (Günay 1992, Kaygısız ve Aybak 2004).

Domateslerde meyve iriliği çeşitlere göre farklılık göstermekle birlikte kültür formlarında meyve çapı 2-15 cm arasında değişiklik gösterir. Meyve çapına göre domatesler küçük, orta irilikte ve iri olarak değerlendirilirler. Meyvelerde yuvarlak, uzun-yuvarlak, basık, yürek, erik, armut ve koza gibi çok farklı tiplere rastlamak mümkündür (Şekil 2.2). Sofralık domateslerde genellikle yuvarlak, yassı-yuvarlak şekil tercih edilir. Salça sanayisinde kullanılacak domateslerde ise şekil önemli değildir. Genel olarak armut ve koza şekilli, silindir şekilli domatesler kullanılır (Diez ve Nuez 2008).

Renk meyvenin olgunlaşması ile değişir. Meyve irileşip normal büyüklüğünü alınca meyve rengi yeşilden kırmızıya dönerek meyve rengini alır. Domates meyvesinin istenilen renge ulaşması karotenoid grubu renk maddelerinden özellikle likopenin birikimine bağlıdır. Domateslerde renge bağlı yeşil, olgun yeşil, pembe, kırmızı, açık kırmızı olmak üzere 5 farklı olgunluk dönemi belirlenmiştir. Meyvenin sertliği de olgunlaşma durumu ile ilişkilidir (Günay 1992, Kaygısız ve Aybak 2004).

Domates tohumları küçük, genellikle 3-4 mm çapında ve böbrek şeklinde olup yuvarlak ve yassıdır. Tohumlar beyaz-gri-sarı renkte olup ve üzerinde beyaz sık tüyler bulunur. Tohum, üzerindeki bu tüylülük özelliği ile diğer *Solanaceae* familyası türlerinden ayrılır. Domates tohumlarının 1 g'ında 300-350 adet tohum bulunur. 1000 tane tohum ağırlığı çeşitlere bağlı olarak 2.7-3.3 g arasında değişim göstermektedir.

Tozlanma ve dölleme normal koşullarda olduğunda bir meyveden 20-400 adet tohum elde edilebilir. Domates tohumları optimum çimlenme sıcaklığında (25°C) 3-7 gün içerisinde çimlenir. Tohumlar 5-10°C sıcaklık ve %30-40 nem bulunan depo koşullarında canlılığını 3-5 yıl koruyabilmektedir (Kaygısız ve Aybak 2004)

Domates meyvesinin %94-95'i su geriye kalan kısmı kuru maddedir. Domatesin kuru maddesinin önemli bir bölümünü şekerler oluşturmaktadır. Domateslerde bulunan amino asitlerden methionin, tyrosin, triptofan miktarı oldukça yüksektir.



Şekil 2.2. Domateste farklı meyve tipleri ve meyve renkleri.

Domates içerisinde A, B₁, B, B₆, C, K vitaminlerini içermekte olup A ve C vitaminleri yönünden oldukça değerlidir. 100 g domates, yetişkin bir insanın günlük A vitamini gereksinmesinin % 20-40'ını karşılar (Gould 1983). Kırmızı domateslerde parlak kırmızı rengi veren likopen insan sağlığı açısından önemli bir antioksidanttır. Likopen serbest radikallerin normal hücre büyümesi ve gelişmesine üzerine olan olumsuz etkilerini önlemektedir. Serbest radikaller kanser, kalp hastalıkları ve erken yaşlanmaya önemli potansiyel olarak bilinmektedir.

Domates bitkisinde olduğu gibi, meyvesinde de toksik alkaloidler olan glikositlerden tomatin ve solanin bulunmaktadır. Bunlardan solanin miktarı yeşil renkli meyvelerde fazla miktarda bulunduğu için domatese acı tadı verir. Yapılan araştırmalar sonucunda 100 g yeşil olum dönemindeki domatesteki 90 mg tomatin bulunduğu belirlenmiştir. Olgunlaşan domateslerde tomatin tomatinaz enzimi ile parçalanmaktadır. Yapay olarak olgunlaştırılan domateslerin, bitki üzerinde olgunlaşan meyvelere göre daha fazla tomatin buldukları belirlenmiştir. Solanin ise sadece yeşil meyvelerde ve bitkinin yeşil aksamında bulunur. 100 g yeşil olumdaki domates meyvelerinde 9-32 mg solanin bulunduğu belirlenmiştir. Duyarlı kişilerde yeşil meyveden 2-5 tane yenmesiyle zehirlenme görülebilir. Domates olgunlaştıkça solanin kaybolur. Portakal renkli domates meyvelerinde ise bu değer 0.1-0.8 mg'a düşmektedir. Domatesin turşu olarak değerlendirilmesi sırasında solanin miktarında düşüş olmaktadır (Davies ve Hobson 1981).

Ülkemizde domates yetiştiriciliğini sınırlandıran etmenler arasında en başta hastalık ve zararlılar gelmektedir. Ülkemiz tarımı açısından ekonomik öneme sahip olan domates, gerek birim alandan alınan ürün miktarı gerekse elde edilen ürünlerin kalitesi bakımından gelişmiş ülkelerle rekabet halindedir. Bunun için domates yetiştiriciliğinde uygun çeşit seçiminden başlanarak bakım şartları, hasat, nakliye ve uygun muhafazanın yapılmasıyla ilgili araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Domates yetiştiriciliğindeki başarıda gerek kalite gerekse hastalık ve zararlılara dayanımı bakımından seçilen çeşidin önemi son derece büyüktür. Günümüzde geliştirilen yeni çeşitlerin yetiştirileceği bölgelerdeki mevcut hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık veya tolerans özelliğine sahip olması istenmektedir. Bu durum hem

elde edilen ürünün verimini hem de kalitesinin yükselmesini sağlamaktadır. Ancak yetiştirilecek çeşit belli hastalık ve zararlılara dayanıklı değilse ve bu hastalık ve zararlılara karşı mücadele de yoksa beklenen verim ve kaliteye ulaşamamaktadır. Bu nedenle çeşit her ne kadar kaliteli olursa olsun hastalığın yayıldığı bölgelerde yetiştiriciliğinin yapılamaması nedeniyle diğer dayanıklı çeşitlerin kullanılması gerekecektir.

Domateste sarı yaprak kıvrıkcık hastalığı (TYLCD) dünya genelinde büyük kayıplara neden olmaktadır. Bu hastalığa neden olan virüsler *Geminiviridae* familyasına dahil olan *Begomovirus* cinsine giren en az beş farklı virüs türü tarafından oluşturulmakta olup tütün beyazsineği (*Besimtia tabaci*) tarafından taşınmaktadır (Fauquet ve Stanley 2005).

Hastalık belirtileri domates çeşitlerine göre değişmekle birlikte genel olarak enfeksiyondan kısa bir süre sonra bitkilerde gelişme yavaşlamakta ve bitkiler bodurlaşmaktadır. Yeni çıkan yapraklarda küçülme, şekil bozukluğu, içe veya dışa doğru kıvrılma ve tüm yaprakları kapsayacak şekilde kenarlarında sararmalar şeklinde ortaya çıkar (Şekil 2.3). Bu virüs ile enfekte olan bitkiler çiçek oluşturmaz, oluşan çiçeklerden de çok azı meyve tutar. Meyve oluştuğunda ise küçük, kuru ve ticari değerini kaybetmektedir.

Domates sarı yaprak kıvrıkcıklığı virüsüne (TYLCV) karşı dayanıklılık yabani domates türlerinde (örneğin *Solanum pimpinellifolium*, *S. habrochaites*, *S. peruvianum* ve *S. chilense*) bulunmaktadır (Laterrot 1992, Pico vd 1996, Pico vd 1999, Pilowsky ve Cohen 2000). Bu hastalığa dayanıklılık mekanizması türlere göre değişmekle birlikte genellikle tek ve tam olmayan dominant ('incompletely dominance' veya 'semi-dominance') ile resesif poligenik ('polygenic recessive') karakter gösterebilmektedir (Lapidot ve Friedmann 2000, Castro vd 2007).

TYLCD'ye dayanıklılık geni Zamir vd (1994) tarafından *S. chilense* LA1969 hattından kültür formlara transfer edilerek çalışılmıştır. LA1969 hattındaki TYLCD dayanıklılığı tam olmayan tek bir *Ty-1* geni ile iki veya üç yardımcı gen tarafından kontrol edilmektedir. *Ty-1* geninin 6. kromozomda bulunduğu görülmüş ve TG297 ile TG97 SCAR DNA markırlarının arasında yer aldığı belirlenmiştir (Zamir vd 1994).



Şekil 2.3. Domates sarı yaprak kıvrıkcık virüsü zararı.

Meloidogyne türlerinin neden olduğu kök-ur nematodu dünyada bitkisel üretimde başta örtü altı sebze yetiştiriciliği olmak üzere domates, muz ve patates alanlarında önemli ekonomik kayıplara neden olan ana zararlıların başında gelmektedir. Nematodlar bitkinin kök sistemine yerleşir ve bitki öz suyunu emerler. Bu durumda bitkinin gösterdiği reaksiyon sonucu köklerde urlar ve anormal oluşumlar meydana gelir (Şekil 2.4). Bunun sonucunda da bitkinin topraktan su ve besin alışverişi kısıtlanmaktadır. Böylelikle bitkide gelişme yavaşlayarak bodurlaşma, sararma, solma, renk değişiklikleri ile çiçek ve meyve silkmeleri meydana gelir. Enfeksiyonun ağır olduğu durumlarda ise bitki tamamen kuruyabilir. Nematod zararı domates ve patıcanlarda genellikle %25–35 arasında ürün kaybına neden olmakla birlikte bu oran bazen %50-60'a kadar yükselebilmektedir (Özarslandan 2009).



Şekil 2.4. Domateste kök-ur nematodu.

Nematod türleri arasında *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. acrita*, *M. exiqa* ve *M. thamsi* bulunmakta olup bu türlerden, *M. incognita* ve *M. javanica*'nın en yaygın ve ekonomik olarak önemli türler olduğu, *M. arenaria* ve *M. hapla*'nın ise ender rastlanan türler olduğu bildirilmektedir (Özarslandan 2009).

Yapılan çalışmalarda dünya genelinde 75 ülkeden elde edilen 1000 kök-ur nematodu popülasyonundan %52'sinin *M. incognita*, %30'unun *M. javanica*, %8'inin

M. arenaria, %8'inin *M. hapla* geriye kalan %2'sini ise diğer türlerden oluştuğu bildirilmektedir (Johnson ve Fassuliotis 1984).

Nematod ile mücadele yöntemlerinin başında genellikle fumigantlar (örneğin metil bromit) veya nematisitlerin kullanımı gelmektedir. Özellikle metil bromit, ozon tabakasında incelmelere neden olduğu ve UV ışınlarının atmosferden geçişini artırması nedenleri ile kullanımı yasaklanmıştır. Nematodlarının mücadelesinde kullanılan nematisitlerin sakıncaları nedeniyle alternatif mücadele yöntemlerine daha fazla ağırlık verilmesi büyük önem taşımaktadır. Alternatif mücadele yöntemlerinden biyolojik mücadelenin henüz araştırma safhasında olması ve pratiğe tam olarak aktarılmaması nedeni ile genetik dayanıklılık ön plana çıkmaktadır.

Nematoda karşı dayanıklı çeşitlerin kullanılması ile nematodun üremesinin tamamen engellemesi veya çok az düzeyde tutulması, özel uygulama tekniği ve pahalı donanım gerektirmemesi nedenleri ile diğer mücadele yöntemlerine göre ucuz çevre dostu olmasından dolayı tercih edilmektedir. Nematoda karşı dayanıklılık aralarında domatesinde bulunduğu değişik kültür bitkilerinde geliştirilmiştir (Milligan vd 1998, Yaghoobi vd 1995, Tamulonis vd 1997a, 1997b, Brown vd 1996, Garcia vd 1996).

M. incognita, *M. javanica* ve *M. arenaria* türlerinin neden olduğu kök-uruna *Mi* geni dayanıklılık göstermekte ancak diğer kök-ur nematodlarına karşı dayanıklılık sağlamamaktadır. 1940'lı yıllarda başlatılan çalışmalarda *Mi* geni *S. peruvianum* PI128657'den kültür formlara aktarılmaya çalışılmış ve tek bir F₁ bitkisinde başarı sağlanmıştır (Smith 1944). Bundan sonraki çalışmalarda Medina-Filho ve Tanksley'e (1983) göre bu bitki *Mi* dayanıklılık kaynağı olarak kullanılmış ve ticari çeşitlerin geliştirilmesinde büyük katkı sağlamıştır. Geleneksel ıslah yöntemlerinden introgresyon ile kültür bitkilerine transfer edilmiş olan *Mi* geni ile birlikte *S. peruvianum* PI128657'nin büyük kromozom bölgesinin transfer edilmiş olması ve bu bölgenin rekombinasyonu kısıtladığı belirlenmiştir (Liharska vd 1996, Messeguer vd 1991, Ho vd 1992). Rekombinasyonun artırılması ve *Mi* genine daha yakın bir markırın bulunmasına yönelik çalışmalar yürütülmüş ve bu çalışmalarda *Mi* genine yakın asit fosfotaz ('acid phosphatase-1' (*Aps-1*)) geni ile birlikte diğer bazı DNA markırları da belirlenmiştir (Ho vd 1992, Kaloshian vd 1998, Williamson vd 1994).

Pyrenochaeta lycopersici (Schneider and Gerlach) diğerk bir toprak kökenli fungus olup domatesin yanı sıra kavun, marul, patlıcan, fasulye ve hıyar gibi kültür bitkilerinde kök sistemi gelişimini engelleyerek verim kaybına neden olmaktadır (Gerlach ve Schneider 1964). Bu fungusun neden olduğu mantari kök çürüklüğü ('corky root rot') hastalığı ekonomik zarara neden olabilecek en önemli ve en yaygın kök hastalıkları arasında yer almaktadır. Fungusla enfekteli köklerde kahverengi nekrotik lekeler, mantarlaşmış esmer kök kısımları ve çatlamış bölgeler oluşur (Şekil 2.5). Hastalığın bulaştığı bitkilerde küçük besleyici köklerin çürümesiyle gelişme yavaşlarak bitki bodurlaşmaktadır.

Pyrenochaeta lycopersici fungusu ılıman bölgelerde %70-75 oranlarına verim kaybına neden olması bakımından önemlilik arz etmektedir (Doğanlar vd 1998). Hastalıkla savaşta metil bromit ve diğerk fungusitler kullanılmakla birlikte bu uygulamaların çevreye ve insan sağlığına olan zararlarından dolayı genetik dayanıklılık önem kazanmaktadır. *Pyrenochaeta lycopersici* etmenine dayanıklılık genleri *Solanum hirsutum* ve *Solanum peruvianum*'da belirlenmiştir (Hogenboom 1970). İlk olarak 1983 yılında mantari kök çürüklüğüne dayanıklılık geni (*py-1*) belirlenmiş olup dayanıklılık geni kültür formlarına transfer edilmiş ve ilerleyen yıllarda bu gene ait DNA markırları belirlenmiştir (Doğanlar vd 1998).



Şekil 2.5. Domateste mantari kök çürüklüğü.

Domates üretiminde olumsuz etkiye sahip olan diğer bir hastalık tütün mozaik virüsünün diğer bir tipi olan domates mozaik virüsüdür (ToMV). Hastalık belirtileri gün uzunluğuna, ışık yoğunluğuna, sıcaklığa, etmenin ırkına ve enfeksiyon zamanına bağlı olarak değişmekle birlikte genel olarak yapraklar üzerinde renk değişikliği, kahverengi çizgiler, genç yapraklarda ipliksi incelmeler (füjer yaprak tipi) ve deformasyonlar olarak kendini göstermektedir (Şekil 2.6).

Domates meyvesinde iç kahverengileşmesi ('Internal browning'), ToMV'nin bir veya birden fazla ırkı tarafından meydana getirilen ve domates meyvelerinde zarar yapan bir hastalıktır. Virüs ile bulaşmış domates bitkilerinin yeşil aksamında hastalık belirtilerine rastlanmadığı halde, meyvelerin kabuk altındaki iç dokularında kahverengi mantarimsı nekrotik dokular oluşturabilmektedir (Şekil 2.6). Yüksek sıcaklıklarda $Tm^2/tm2^2$ ırkı meyvede koyu-kahverengi benekler oluşturabilmektedir (Dax vd 1998). Hastalığın ekonomik önemi enfeksiyon zamanına göre değişkenlik göstermekle birlikte genç bitkilerin enfeksiyonu sonucunda ürün kaybının %50 oranına kadar ulaştığı saptanmıştır (Anonim 2010).

ToMV dayanıklı çeşitlerin elde edilmesi çalışmaları 1940'lı yıllarda başlatılmıştır. İlk çalışmalarda $Tm-1$ dayanıklılık geni için *Solanum peruvianum* kullanılmıştır. 1960'lı yıllarda $Tm2^2$ geni aynı kaynaktan kültür bitkilerine transfer edilmiştir (Motoyoshi ve Oshima 1977). ToMV dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesinde $Tm2^2$, $Tm-1$ göre daha etkin olarak kullanılmaktadır (Dax vd 1998).

Domateste bulunan beş farklı ToMV dayanıklılık geninden ikisi olan $Tm2$ ve $Tm2a$ 'da çoğu dayanıklılık markırlarında olduğu gibi *Solanum peruvianum* L. orijinlidir (Ohmori vd 2000). Her iki gen domateste 9. kromozomun uzun kolunda yer almaktadır. Bu genler bazı ToMV ırklarına dayanıklılık göstermekte olup genomda bulunmaları durumunda virüsün hücreler arası geçişini önleyerek bitkiye dayanıklılık mekanizması sunmaktadır (Nishiguchi ve Motoyoshi 1987, Meshi vd 1989, Ohmori vd 2000). Yapılan çalışmalarda $Tm2$ veya $Tm2a$ lokuslarından sadece birini taşıyan çeşitlerin ToMV hastalığına daha hassas oldukları görülmüş ancak bu durumun tam anlamıyla nasıl gerçekleştiği ortaya konulamamıştır (Ohmori vd 2000).



Şekil 2.6. Domates mozaik virüsü.

Bitkilerde *Verticillium* türleri büyük ekonomik kayıplara neden olan diğer bir hastalık etmenidir. *Verticillium* dünyada önemli tarımsal ürünleri kapsayan sayısız bitki türünde solgunluğa neden olabilen toprak kaynaklı bir patojendir. Ülkemizde *Verticillium* solgunluğuna neden olan fungus pamuk, susam, ayçiçeği, bamyas, domates, biber, patlıcan, börülce, fasulye, patates, yerfıstığı, kavun, maydanoz, şeftali, kayısı, zeytin, karanfil, datura, domuz pıtrağı, horozibiği ve pire otunda saptanmıştır.

Domateste *Verticillium* solgunluğuna *Verticillium dahliae* Kleb. fungusu neden olmaktadır. Solgunluk bitkinin iletim demetlerine yerleşen fungus tarafından oluşturulmakta ve yapraklarda solma, alt yaprak uçlarında sararmalara neden olmaktadır. Ayrıca gövde ve yaprak ayasında kahverengi lekeler şeklinde kendini gösterebilmektedir (Şekil 2.7). *Verticillium* zararı bitkilerin yapraklarını kuruttuğundan dolayı, verimi büyük ölçüde düşürmekle birlikte nadir olarak ölümlere de neden olabilmektedir (Karahana 1965).

Hastalığa karşı etkili bir kimyasal mücadele olmaması nedeniyle kültürel önlemlerle mücadele yapılmaya çalışılmaktadır. Kültürel yöntemler arasında; toprak sıcaklığında ani düşüşlerin engellenmesi amacıyla düzenli sulamanın yapılması, yetiştiriciliğin yapılmadığı sıcak dönemlerde solarizasyon uygulanması, hastalıklı bitkilerin sökülüp ortandan uzaklaştırılması, toprak işlemeye dikkat edilmesi ve bunların yanı sıra ekim nöbetinin uygulanması sayılabilmektedir. Kültürel yöntemler veya tarım ilaçları kullanılarak hastalıktan kurtulma çabaları, *Verticillium dahliae* ile mücadelede çok fazla etkin olmadığı gibi ekonomik de değildir. Yetiştiricilik sırasında kültürel önlemler almak, hastalığın çıkışını ve yayılmasını yavaşlatıcı düşük etkili bir korunma yöntemi olduğundan, dayanıklı çeşit kullanmak tek çözüm yolu olarak ortaya çıkmaktadır.

Domates bitkisinde *Verticillium dahliae* Kleb. ırk 1'e dayanıklılık 9. kromozomun kısa kolunda bulunan tek bir dominant gen (*Ve*) tarafından kontrol edilmektedir (Simko vd 2004). Bu gen ilk kez Schaible (1951) tarafından 'Peru Wild' yabancı domates hattından belirlenmiş olup daha sonra Darby vd (1978) tarafından beş kez



Şekil 2.7. Domateste *Verticillium* solgunluğu.

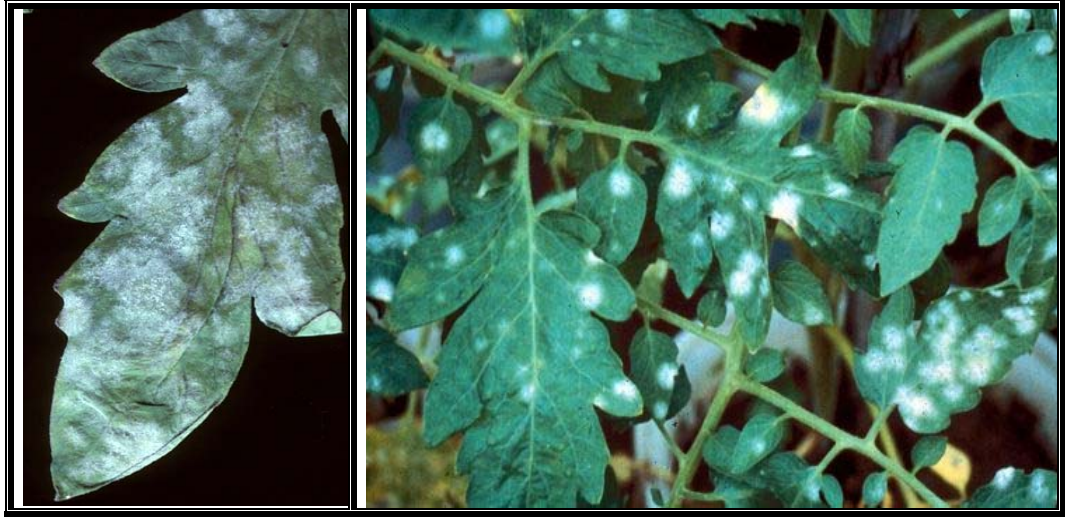
geriye melezleme ve iki generasyon kendileme çalışmaları ile kültür bitkilerine transfer edilmiştir (Darby vd 1978).

Ve dayanıklılık genine ilişkin ilk DNA markırı yakın izogenik hatlar ('Near Isogenic Lines', NIR) kullanılarak Kawchuk vd (1994) tarafından belirlenmiştir. Belirlenmiş olan bu RAPD markırı yine aynı araştırmacılar tarafından 1998 yılında daha etkin bir markır sistemi olan SCAR'a dönüştürülmüştür. *Verticillium* (*Ve*) lokusuna özgü SCAR markırı kullanılarak dayanıklı, hassas veya heterozigot ve homozigot hatlar seçilebilmektedir.

Domates bitkisinde önemli verim kayıplarına neden olan diğer bir hastalık küllemedir. *Oidium lycopersicum* fungusunun neden olduğu bu hastalık özellikle Kuzey Yarımküre'de etkili olmaktadır. Külleme etmeni yapraklarda küçük, düzensiz tozlu beyaz alanlar olarak başlayıp daha sonra yaprak sapı ve gövdede de benzer şekilde beyaz tozlu alanlar olarak ilerleme gösterir. Hastalık etmeninden ilk önce yaşlı olan alt yapraklar etkilenir. Daha sonra genç olan üst yapraklara doğru yayılma gösterir ve yapraklar zamanla sarararak hastalıktan dolayı kururlar (Şekil 2.8). Hastalık bitkilerde daha kısa hasat periyodu oluşturması, meyvelerde küçülme ve azalmasına bağlı olarak önemli ölçüde verim kaybına neden olmaktadır.

Günümüze değin geliştirilmiş olan domates çeşitlerinin büyük çoğunluğu külleme hastalığına duyarlıdır. Dolayısıyla dayanıklılık genini (*Ol-1*) içermemektedir (Huang vd 2000). Bu nedenle de hastalık etmeninden korunmak amacıyla genellikle fungusitler kullanılarak domates yetiştiriciliği yapılabilmektedir.

Külleme hastalığına dayanıklılık kaynağı olan *Ol-1 geni* yabancı domateslerde belirlenmiş olup bunlardan *S. hirsutum* ve *S. parviflorum* detaylı olarak çalışılmıştır. Yapılan çalışmalarda dayanıklılık mekanizmaları açısından *Ol-1*'in tek gen tarafından kodlandığı ve eksik dominant özellik gösterdiği görülmüştür. Domateste 6. kromozom üzerinde bulunduğu belirlenen *Ol-1* geninin 6. kromozom üzerindeki konumu *Aps-1*, *Mi* ve *Cladosporium fulvum* dayanıklılık genlerinden olan *Cf-2/Cf-5'e* yakın olduğu belirlenmiştir (Van der Beek vd 1994).



Şekil 2.8. Domateste külleme hastalığı.

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* (Sacc.) [Snyder & Hansen] toprak kökenli bir fungus olup domateste solgunluk hastalığına (fusarium solgunluğuna) neden olan diğer önemli bir etmendirdir (Staniaszek vd 2007). Bu fungus Şekil 2.9'da görüldüğü gibi kökte bulunan iletim demetlerine zarar vermekte ve bitkinin su alımını önleyerek bitkiyi öldürebilmektedir (McGrath vd 1987, Malhotra ve Vashistha 1993). Hastalığa dayanım için yapılan ıslah çalışmaları ile aralarında domatesinde bulunduğu bazı kültür bitkilerinde fusarium solgunluğuna karşı dayanıklılık genleri belirlenmiştir (Malhotra ve Vashistha 1993).

Fusarium solgunluğuna neden olan 3 farklı *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* ırkı belirlenmiştir (Stevens ve Rick 1986, Beckman 1987). Yabani domates türlerinde yapılan çalışmalarda 4 farklı dayanıklılık geni tespit edilmiş olup bu genler R genleri olarak isimlendirilmiştir (Huang ve Lindhout 1997, Frary ve Tanksley 2001).

Moleküler haritalama çalışmaları ile *I-1* ve *I-3* genlerinin domateste 7. kromozomda, *I* ve *I-2* genlerinin ise 11. kromozomun kısa ve uzun kollarında buldukları saptanmıştır (Staniaszek vd 2007). İntrogresyon çalışmaları ile *I-2* geni *S. pimpinellifolium*'dan kültür formalarına transfer edilmiş olup bu gen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 2. ırkına dayanıklılık sağlamaktadır (Stall ve Walter 1965).

Gennaro vd (1999), domateste yapmış oldukları bir çalışmada kök çürüklüğüne neden olan *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*'ye dayanıklılık geninin 9 nolu kromozom üzerinde bulunduğunu ve tek bir dominant genle ifade edilmekte olduğu belirlemişlerdir. Çalışmada RAPD tekniği kullanılarak toplam 1000 adet 10 mer'lik primer değişik sayıda dayanıklı ve hassas domates hatlarında kullanılmış ve bu RAPD primerlerinden üçünün (116, 194 ve 655) *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*'ye dayanıklılık genine bağlı olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada ayrıca RFLP tekniği de kullanılmış ve elde edilen TG101 kodominant markırının *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*'ye dayanıklılık genine bağlı olduğu teyit edilmiş ve TG101 markırı ile gen arasındaki genetik ilişki 5.1 cM uzaklıkta olduğu belirlenmiştir (Gennaro vd 1999).



Şekil 2.9. Domateste fusarium solgunluğu hastalığı.

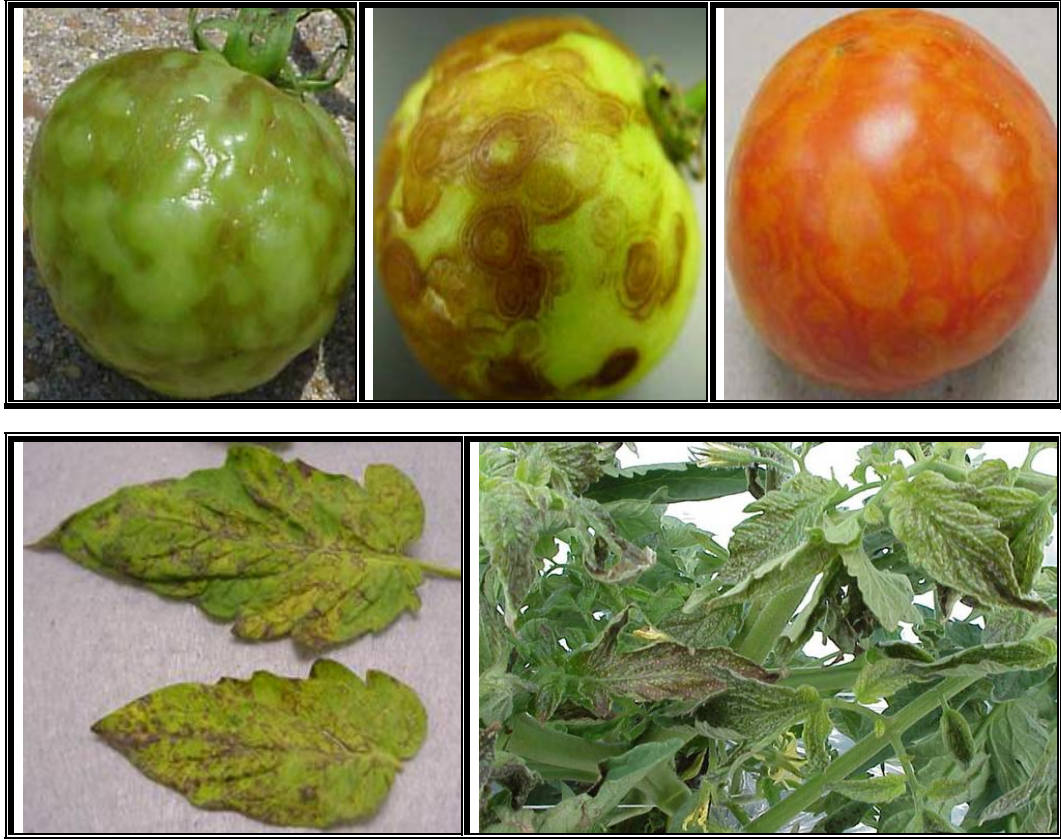
Domates yaprak küfü *Cladosporium fulvum* fungusu neden olmaktadır. Bu fungus yapraklar üzerinde önce sarı lekeler daha sonra bu lekelerin alt kısmına rastlayan yerde kahverengimsi bir küf meydana getirerek kısa zamanda bütün yaprakları kaplayarak bitkinin kurummasına neden olabilmektedir (Şekil 2.10).

Bu hastalığa dayanıklılık çok sayıda gen tarafından (*Cf-0*, *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5* ve *Cf-9*) kontrol edildiği öngörülmektedir. Bu genlerden *Cf-4* ve *Cf-9* 1 nolu kromozomun kısa kolu üzerinde bulunmakta olup bu genlerden *Cf-9* *Cladosporium fulvum* hastalığına dayanıklılık yönünden en etkili gen olduğu tespit edilmiştir (Takken vd 1999). *Cf-9* genine 6 cM bir yakınlıkta TG236 ve CP46 adlı iki RFLP markırı geliştirilmiştir (Balint-Kurti vd 1994). Diğer bir çalışmada ise Thomas vd (1995) *S. Lycopersicum* x *S. pennellii* hibritinden elde edilen F₂ bireylerini kullanarak 3 adet AFLP markırının *Cf-9* genine bağlı olduğunu belirlemişlerdir.



Şekil 2.10. Domateste yaprak küfü.

Domates lekeli solgunluk virüsü ('Tomato spotted wilt tospovirus-TSWV'), *Bunyaviridae* familyasına bağlı *Tospovirus* grubuna dahil bir virüs olup, *Thrips tabaci*, *T. setosus*, *T. palmi*, *Frankliniella occidentalis*, *F. fusca*, *F. intonsa*, *F. schultzei* ve *Scirtothrips dorsalis* türleri ile etkin olarak taşınabilmektedirler. Hastalık önce kahverengi daha sonra bronza dönüşen lekeler oluşturarak yaprakların aşağı ve içe doğru kıvrılmalarına ve kırılğan bir yapıya dönüşmesine neden olmaktadır. Meyveler üzerinde ise çok sayıda iç içe geçmiş, kabarık halkalar şeklinde lekeler görülmektedir (Şekil 2.11). Virüsle bulaşık bitkilerde çevre şartları, bitkinin hastalandığı dönem, etmenin yoğunluğu ve yaygınlığına bağlı olarak bazen %100'e ulaşabilen zararlar oluşabilmektedir.



Şekil 2.11. Domates lekeli solgunluk virüs hastalığı.

Domates lekeli solgunluk virüsüne karşı *Sw1a*, *Sw1b*, *Sw2*, *Sw3*, *Sw4*, *Sw-5* ve *Sw-6* olmak üzere yedi adet gen belirlenmiştir (Anfoka vd 2006). Finlay (1953) yapmış olduğu bir araştırmada TSWV dayanıklılığını dominant *Sw-1a* ve *Sw-1b*, resesif *Sw-*

2, *Sw-3* ve *Sw-4* genleri tarafından kontrol edildiğini belirlemiştir. TSWV dayanıklılık genlerinden *S. peruvianum* cv Stevens'da elde edilen dominant özellikli *Sw-5* dayanıklılığı modern bitki ıslahında yaygın olarak kullanılmaktadır (Roselló vd 1998, Stevens vd 1992, Van Zijl vd 1986). *Sw-5* geninin bir çok tospovirüs türü ve bu türlerin bazı izolatlarına dayanıklılık sağlaması nedeni ile tercih edilmektedir (Boiteux ve Giordano 1993). Bunlara ek olarak domateste 9 nolu kromozomun uzun kolunda belirlenen *Sw-5* geni basit kalıtmı tek bir gen tarafından kontrol edilmekte olup Mendel kuralları çerçevesinde açılımı göstermektedir. Bu özelliği ile ekonomik önemi olan domates çeşitlerine introgresyon çalışmaları ile aktarılmıştır (Boiteux ve Giordano 1993, Stevens vd 1995, Langella vd 2004).

Modern tarımsal faaliyetler arasında hastalık ve zararlılara dayanıklı hat ve çeşitlerin geliştirilmesi yanında genetik açıdan kalite özellikleri yönünden üstün çeşitlerinde geliştirilmesinde yararlar bulunmaktadır. Domateste dominant bir genin (*B*) varlığı meyvenin beta-karoten yönünden zengin likopen yönünden düşük olmasına neden olmaktadır. Domateste *B* lokusu 6. kromozomun uzun kolu üzerinde yer almaktadır. Beta-karoten A vitaminin öncü molekülü olup insan beslenmesinde önemli bir yeri bulunmaktadır. Paiva ve Russell (1999) beta-karotenin antioksidan özelliğinin bulunduğunu ve bu nedenle de insan beslenmesinde önemli olduğunu vurgulamaktadır. Vitamin A eksikliği özellikle gelişmekte olan ülkelerde çocuklarda hastalıkların oluşumu yanında 40'lı yaşlardan sonra insanlarda görme bozukluklarına neden olduğu bilinmektedir. Bu nedenle de çeltikte altın çeltik projesi gerçekleştirilerek vitamin A yönünden zengin çeltik çeşitleri ('Golden Rice') geliştirilmiştir.

Lincoln ve Porter (1950) ilk olarak *B* geninin varlığının yeşil renkli meyveli *S. hirsutum* Humb. & Bonpl. ve kırmızı renkli meyveli *S. lycopersicum* arasında yapılan melezleme çalışmaları ile ortaya koymuştur. Bundan sonraki çalışmalarda araştırmacılar beta-karoten içeriğini artırmak amacı ile geleneksel ıslah yöntemleri kullanarak kırmızı renkli ancak düşük beta-karoten içeren çeşitlere sarı renkli meyveli yüksek beta-karoten içeren çeşitlerden *B* genini aktarmaya yönelik çalışmalar gerçekleştirmişlerdir (Zhang ve Stommel 2001).

Diğer bir kalite unsuru olarak domateste apaz genlerini taşıyan çeşitler elde etmek önemlidir. *Aps-1* geni apaz enzimlerini kodlamakta ve düşük pH değerlerinde fosfomonoesterlerdeki inorganik fosfatı hidrolize ederek bitkilerin fosfatı daha etkin kullanmasını sağlamaktadır (Williamson ve Colwell 1991).

Bitkilerde apaz enzimlerinin birçok rolü bulunmakla birlikte bunların başında organik fosfattan inorganik fosfat üretimi gelmektedir. Domateste apaz enziminin iki alleli bulunmakta ve bunlardan biri olan *Aps-1*, *Mi* geni ile birlikte 6. kromozom üzerinde yer alarak nematoda dayanıklılık çalışmalarında *Mi* geni yönünden seçim için markır olarak kullanılmaktadır (Williamson ve Colwell 1991).

Hastalık ve zararlılardan korunmak amacıyla tarımda yaygın olarak kimyasal mücadele yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak kimyasal mücadelenin çevre ve insan sağlığına büyük zararları olduğu bilinmektedir. Bu durum hastalık ve zararlılara karşı uygulanacak mücadelede genetik dayanıklılığın en etkin yol olduğunu göstermektedir. Gerek hastalık ve zararlılara dayanıklı gerekse kalite yönünden nitelikli yeni çeşit geliştirme amacıyla tüm kültür bitkilerinde olduğu gibi domateste de geleneksel ıslah yöntemleri uzun yıllardır kullanılmaktadır. Dayanıklılık ve kalite kalcımı dominant ve kuvvetli bir gene dayanıyorsa, hibrit çeşitlerin geliştirilmesinde başarı ile kullanılabilir (Boyacı 2007). Geriye melezleme çalışmaları daha çok hastalık ve zararlılarla, kalite özellikleri yönünden üstün özelliklere sahip yabancı bitkilerdeki genlerin kültür bitkilerine aktarılmasında başarıyla kullanılmakta ancak bazı türlerle yapılan melezlemelerden fertil bireyler elde edilememektedir.

Son yıllarda hızlanan genetik mühendisliğinden dikkate değer başarılar beklenmekte ancak uluslararası büyük sermayelerin gelişmekte olan ülkelerdeki bıraktığı etkiler nedeni ile beklenen yararları tam olarak ortaya konulamamıştır. Bu durumda bitki ıslahçıları ve araştırmacıları tarafından genetik mühendisliği dışında diğer bazı yöntemler kullanarak veya geliştirerek yüksek kalitede, hastalık ve zararlılara dayanıklı çeşitleri geliştirmeye yönelik çalışmaların yapılması gerekmektedir. Genetik mühendisliği yöntemlerinin dışında DNA markır yöntemleri veya Targetting Induced Local Lesion in Genomes (TILLING) gibi ters genetik yöntemlerinin kullanılması gerekmektedir. Günümüzde hastalık ve zararlılara

dayanıklılık genlerinin (lokusların) bir kısmı DNA markırları yardımıyla belirlenebilmektedir (Zhang ve Stommel 2001, Castro vd 2007, Stainiaszek vd 2007). DNA markır yöntemleri kullanılarak hastalık ve zararlılara dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesinde, var olan genlerin belirlenmesinde ve birden fazla hastalık, zararlı veya kalite kriterlerinin belirlenebileceği yeni yöntemlerin geliştirilmesinde yararlar bulunmaktadır (Dax vd 1998, Doğanlar vd 1998, Kawchuk vd 1998, Huang vd 2000, Ohmori vd 2000).

DNA markırları veya işaretleyicileri (belirteçleri), bakteri, fungus, nematod, virüs, bitki ve hayvan cins, tür veya çeşitleri arasındaki farklılığın tespit edilmesinde, çeşitlerle ebeveynleri arasındaki benzerliklerin belirlenmesinde, önemli hastalık ve zararlıların kromozom üzerindeki konumlarının belirlenmesinde (haritalama), cinsiyet tayininde, gıda maddelerinin içeriklerinin belirlenmesinde, kullanılan tür ve cinslerin ayırt edilmesinde, genomda bulunan gen veya genlerin fiziksel olarak karakterize edilmesinde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (İnce vd 2010a, İnce vd 2010b).

Günümüzde oldukça farklı DNA markır teknikleri belirlenmiş olup değişik amaçlarla yönelik olarak kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan DNA markır teknikleri içerisinde; Sınırlandırılmış Kısm Uzunluk Polimorfizmi (SKUP veya 'Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)'), Mikrosatellit veya Basit Tekrar Sekansları Polimorfizmi (BTSP), Basit Tekrarlı Sekanslar Arası Polimorfizmi (BTSAP veya 'Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR)'), Çoğaltılmış Kısm Uzunluk Polimorfizmi (ÇKUP veya 'Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)'), Minisatellite veya Yönlendirilmiş Minisatellitli DNA Çoğaltımı (YMDÇ veya 'Directed Amplification of Minisatellite DNA (DAMD)'), Rastlantısal Çoğaltılmış DNA Polimorfizmi (RÇDP veya 'Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)'), Tek Sarmallı Uygunluk Polimorfizmi (TSUP veya 'Single Stranded Conformational Polymorphism (SSCP)'), Tek Nükleotid Polimorfizmi (TNP veya 'Single Nucleotid Polymorphism (SNP)'), Polimeraz Zinir Reaksiyonu-Kısm Uzunluk Polimorfizmi (PZR-SKUP veya 'Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)'), Çoğaltılarak Kesilmiş Polimorfik Sekans Polimorfizmi (ÇKPS veya 'Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS)'), Sekansı Karakterize Edilmiş Alanlar (SKEA veya 'Sequence Characterized

Amplified Region (SCAR)'), 'CAPS-Mikrosatellit' (CAPS-Microsatellite) ve Doğrudan Sekans Analizleri (DSA veya 'Direct Sequencing') gibi teknikler kullanılmaktadır. Bu tekniklerin hemen hemen hepsi, morfolojik ayırım tekniklerine ve diğer moleküler ayırım tekniklerinden olan izoenzim tekniğine oranla daha kolay, ucuz ve güvenilirdir (Zhang ve Stommel 2001, Skupinova vd 2004, Sharma vd 2008, Karaca vd 2008).

Yukarıda adları verilen DNA markırlarının seçimi birçok faktöre bağlıdır. Bu faktörlerin başında tekniğin basitliği, doğruluğu, tekrarlanabilirliği ve tekrar üretilebilirliği yanında araştırmacıların ve laboratuvarların donanımıyla da ilişkilidir. Mikrosatellit tekniği tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik ve basitlik açısından en önde gelen markır sistemi olmasına karşın üzerinde çalışılan genoma özgü primerler gerektirdiği için birçok bitkide kullanımı kısıtlıdır.

RAPD sisteminin basitliği ve tekrarlanabilirliği ('repeatability') dışında tekrar üretilememesi ('reproducibility') sorunu nedeniyle günümüzde kullanımı azalmaktadır. Tekrarlanabilirlik aynı örneklerle aynı termal döngü cihazında aynı sonuçların alınması tekrar üretilebilirlik ise farklı araştırmacıların farklı termal döngü cihazlarında aynı sonucu ulaşılması olarak bilinmektedir (Karaca vd 2008). ISSR markır sistemi RAPD markırlarına oranla daha güvenilir olmakla birlikte çoklu bant vermesi ve çözünürlüğünün düşük olması en büyük dezavantajdır (Sharma vd 2008).

Günümüzde birçok kültür bitkisinde olduğu gibi domateste bakteri, fungus, virüs, kök uru nematoduna dayanıklılık ve kalite lokuslarının belirlenmesinde DNA markırları etkin olarak kullanılmaktadır. Örneğin domateste yaygın olarak zarar veren *Meloidogyne incognita* Kofoid & White nematoduna karşı markır yardımıyla seleksiyonda kullanılacak markır sistemi Skupinova vd (2004) tarafından belirlenmiş olup yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Eş-dominant CAPS markırını kullanarak homozigot dayanıklı ve homozigot hassas hatlar ve heterozigot genotipler kolaylıkla belirlenebilmektedir.

Domateste diğer bir virüs hastalığına (TYLCD) *Begomovirus* cinsine ait virüsler neden olmaktadır. Domateste sarı yaprak kıvrıklığı hastalığı olarak bilinen bu hastalığa karşı dayanıklılık lokusu (*Ty-1*) Castro vd (2007) tarafından geliştirilmiştir.

Dominant özellik gösteren CAPS markırı kullanılarak hassas hatlar homozigot ve heterozigot dayanıklı hatlardan ayırt edilebilmektedir.

Moleküler çalışmalarla domates mozaik virüsüne (ToMV) dayanıklılık genlerinden olan *Tm2²* geninin belirlenmesinde kullanılabilen 5 farklı DNA markırı geliştirilmiştir (Tanksley vd 1992, Dax vd 1994, Young vd 1988). ToMV dayanıklılık lokusu *Tm-1* için dominant RAPD markırı Ohmori vd (1995) tarafından belirlenmiştir. Aynı araştırmacılar tarafından 1996 yılında *Tm-1* için bir SCAR markırı geliştirmiş olup bu markır RAPD markırına göre daha güvenilir sonuçlar vermektedir.

Toprak kökenli *Ralstonia solanacearum* bakterisinin neden olduğu bakteriyel solgunluk hastalığı dünya genelinde aralarında domatesin de bulunduğu birçok bitkinin üretimini olumsuz etkilemektedir. Miao vd (2009) bu hastalığa dayanıklılık markırı belirlemişlerdir. Ancak bu markır dominant özellikte olup bu hastalığa karşı dayanıklılık markırının kullanımında sorunlar yaşanmaktadır. Bu markır dayanıklı hatlarda yaklaşık 200 baz çifti uzunluğunda bir markır verirken hassas yada dayanıksız hatlarda herhangi bir markır üretememektedir. Bu durum ise hassas hatların belirlenmesinde oluşabilecek PZR hatalarından dolayı kullanımını sınırlamaktadır.

Domateste önemli bir diğer fungus zararı *Oidium lycopersicum* tarafından özellikle Kuzey Yarımkürede etkili olmakta ve çok sayıda çeşitte büyük oranda verim kaybına neden olmaktadır. Külleme hastalığı için Huang vd (2000) beş adet SCAR markırı geliştirmiştir. Bu markırlardan biri dayanıklı diğeri ise hassas hatların teşhisinde kullanılabilir.

Domateste *Verticillium* solgunluğuna *Verticillium dahliae* Kleb. fungusu neden olmaktadır. *Ve* dayanıklılık genine ilişkin ilk DNA markırı yakın izogenik hatlar ('Near Isogenic Lines', NIR) kullanılarak belirlenmiştir (Kawchuk vd 1994). Belirlenmiş olan bu RAPD markırı yine aynı araştırmacılar tarafından 1998 yılında daha etkin bir markır sistemi olan SCAR'a dönüştürülmüştür. Kawchuk vd (1998) geliştirdikleri SCAR markırı *Ve* genine 0.67±0.49 cM harita birimi düzeyinde tespit edilmiştir. SCAR markırı hem dominant (*Ve*) hem de resesif (*ve*) genleri belirleyebilmektedir. Ancak bu markırların boyu yaklaşık 1 kb büyüklüğünde olması

nedeni ile standart agaroz jel elektroforesis çalışmalarında kullanımında güçlükler bulunmaktadır.

Pyrenochaeta lycopersici (Schneider and Gerlach) fungusu tarafından neden olan mantari kök çürüklüğü hastalığı domatesten önemli düzeyde verim kaybına sebep olmaktadır. Bu hastalığa dayanıklılık markırı Doğanlar vd (1998) tarafından belirlenmiştir. CAPS markırı eş-dominant (ko-dominant) karakterde olup bu hastalığa dayanıklı veya hassas domates hatlarının belirlenmesinde kullanılmaktadır.

TSWV dayanıklılık geni olan *Sw-5* geninin belirlenmesinde değişik DNA markır teknikleri kullanılmıştır. Bu markırlardan RFLP tekniği kullanılarak *Sw-5* geninin domatesin 9. kromozomunun uzun konumunda olduğu belirlenmiştir (Stevens vd 1995, Chague vd 1996). Stevens vd tarafından (1996) kodominant RAPD markırı belirlenmiş ve daha sonra SCAR markırına dönüştürülmüştür. Belirlenen SCAR421 markırının *Sw-5* genine uzaklığı 1 cM'dan daha az olduğu belirtilmiştir. *Sw-5* genine çok yakın bağlılığı belirlenen markırlar MAS çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Stevens vd 1995, Stevens vd 1996, Chague vd 1996).

Toprak kökenli hastalık olan fusarium kök çürüklüğü [*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL)] diğer bir domates kök hastalığıdır. Bu hastalık özellikle serin mevsimlerde daha etkili olmaktadır. Fazio vd (1999) fusarium kök çürüklüğüne eş-dominant karakterli RAPD markırı geliştirmiştir. Bu markır kullanılarak fusarium kök çürüklüğüne karşı dayanıklı, hassas veya heterozigot karakterli hatlar belirlenebilmektedir.

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* domates yetiştiriciliğinde dünya genelinde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* dayanıklılık farklı ırklara karşı farklı genler tarafından sağlanmaktadır. İki nolu ırka dayanıklılık *I-2* dayanıklılık geni tarafından sağlanmaktadır. Staniaszek vd (2007) yapmış oldukları bir çalışmada *Rsa* I ve *Fok* I restriksiyon enzimleri kullanarak iki farklı CAPS markırı geliştirmişlerdir.

Yaprak zararlılarından *Liriomyza trifolii* Burgess çok sayıda bitkide özellikle fide döneminde fotosentez yeteneğini azaltarak büyük zararlar vermektedir. Bu zararlıya

karşı dayanıklılık genleri genellikle kültür formlarına yabancı formlar kullanılarak aktarılmaktadır. Moreira vd (1999) domateste RAPD dominant dayanıklılık lokusunu belirlemişlerdir.

Domateste *B* lokusu tarafından kontrol edilen beta-karoten için Zhang ve Stommel (2001) tarafından eş-dominant karakterde CAPS markırı geliştirilmiştir. Bu markır kullanılarak herhangi bir hattın *B* lokusu yönünden heterozigot (*Bb*) yada homozigot (*BB*, *bb*) olduğu belirlenebilmektedir.

Domateste asit fosfataz (*Aps-1*) geni kök ur nematoduna dayanıklılık genine (*Mi*) yakın bir konumda bulunmakta ve *Mi* dayanıklılığının tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır. *Aps-1* genine dayanıklılık RFLP, RAPD ve CAPS gibi değişiklik DNA markır sistemleri kullanılarak belirlenebilmektedir (Ho vd 1992, Messeguer vd 1991).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Bitki Materyali

Araştırmada belirtilen hastalık ve zararlılara ait dayanıklılık genlerinden bir kısmını içeren 8 ticari hibrit (Vuslat F₁, Orient F₁, Pegasus F₁, Tayfun F₁, Victory F₁, Bestona F₁, Azra F₁ ve Reyhan F₁) domates çeşidi ile özel bir tohum firmasından elde edilen 40 adet F₂ aşamasındaki bitkiler kull anılmıştır.

Çalışmada kullanılacak olan domates çeşitleri ve hatlarına ait tohumlar 2:1:1 oranında torf, vermikulit ve perlit karışımıyla hazırlanmış olan viyollere uygun şekilde etiketlenerek ekim işlemi gerçekeştirilmiştir. Bitki besin maddesi ihtiyaçları ve gerekli kimyasal ilaçlamalar yapılarak fideler yetiştirilmiş ve DNA ekstraksiyonu için gerekli miktarda yaprak örnekleri alınarak -20°C'lik derin dondurucuda saklanmıştır.

3.2. DNA Ekstraksiyonu

Moleküler analizlerde kullanılan çeşit ve hatların genomik DNA ekstraksiyonları Karaca vd (2005) tarafından geliştirilmiş olan DNA ekstraksiyon metoduna göre yapılmıştır. Bu metot uygulama esnasında modifiye edilerek 65°C inkübasyon süresi 2 saat'e çıkarılmış ve ekstraksiyon hacmi 2 mL'ye indirilerek 'miniprep' olarak kullanılmıştır. Ekstraksiyon işleminin son basamağında DNA 200 µL TE çözeltilinde çözülmüştür.

3.2.1. Ekstraksiyon çözeltisi (EB)

DNA ekstraksiyon metodu iki ana çözelti kullanılarak gerçekeştirilmiştir. İlk çözelti ekstraksiyon çözeltisi (EB) olarak isimlendirilmiş ve tek bir örnek için [0.35 M sorbitol, 100 mM tris(hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride (TRIS-HCl, pH 7.5), 5 mM ethylenediamine tetraacetic acid, disodium salt (EDTA, pH 7.5), % 2 (v/v) polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween-20), %1 (v/v) octyl phenol ethoxylate (Triton X-100) ve %1 (v/v) β-mercaptoethanol (BME)] konsantrasyonları uygulanılmıştır.

3.2.2. Lezyon çözeltisi (LB)

Ekstraksiyon metodunda kullanılan ikinci çözelti ise lezyon çözeltisi (LB) olarak isimlendirilmiştir. DNA ekstraksiyonu için her bir örnek solüsyonu olarak 200 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, pH 8.0, 2 M NaCl, %2 (w/v) Polyvinylpolypyrrolidone, Insoluble (PVPP), %2 (w/v) cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), %2 (v/v) octyl phenol ethoxylate (Triton X-100) ve %2 (v/v) β -mercaptoethanol (BME) hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılan PVPP suda çözünmeyen PVPP formunda olup suda çözünen formuna göre daha etkin bir şekilde çalıştığı ön denemelerde belirlenmiştir.

3.2.3. DNA ekstraksiyon protokolü

- 1) Her bir bitkiden alınan yaklaşık 1 gram yaprak örneği ve 100 mg PVPP havana konularak havaneli yardımıyla sıvı azot içerisinde toz haline gelinceye kadar iyi bir şekilde ezilmiştir.
- 2) Toz haline getirilen örnekler 2 mL'lik ependorf tüplere transfer edilmiş ve tüp içerisindeki sıvı azot tamamen buharlaşmaya denk buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra üzerine 1000 μ L EB çözeltisi eklenmiş ve 3-5 dakika vorteks cihazı yardımıyla çözeltide iyi bir şekilde dağılımları sağlanmış ve 10000 x g de 10 dakikalık sürede santrifüj edilmiştir.
- 3) Santrifüj sonrasında tüplerdeki süpernatant (üst faz) dikkatlice dökülmüş ve alttaki pellet (kalıntı) 350 μ L LB çözeltisinde birkaç dakika vortekslenerek çözülmüş ve üzerine 350 μ L 8 M LiCl eklenerek tekrar vortekslenerek iyi bir şekilde karışması sağlanmıştır.
- 4) Daha sonra doku çözelti karışımına 25 μ L %20'lik SLS ('Sodium lauryl sarcosinate') çözeltisi eklenmiş ve vorteks cihazı yardımıyla karıştırıldıktan sonra tüpler parafilm ile sarılarak 65°C'ye ayarlanmış su banyosunda 2 saatlik süreyle bekletilmiştir. Bekleme esnasında her 10 dakika da bir 3-5 dk vortekslenmiş ve en son su banyosundan çıkartıldıktan sonra tekrar vortekslenerek karıştırılmıştır.
- 5) İnkübasyon sonrası tüpler granüle buz üzerine alınmış ve her bir örnek üzerine 1:24 oranında Kloroform İzamil Alkol (CIA) eklenmiş ve tüpler ters-düz

edilerek CIA süspansiyonuna iyi bir şekilde karışımı sağlanarak 10 dakika oda sıcaklığında (25°C-28°C) bekletilmiştir.

- 6) Daha sonra tüpler 10000 x g de 10 dakika santrifüjlenerek 3 faz oluşturulmuş ve en üst fazdan (süpernatant) alınabildiği kadar hacimdeki süpernatant (genellikle bu miktara 600 µL) yeni bir tüpe alınmıştır.
- 7) Her bir tüpten alınan üst faz miktarı (600 µL) kadar üzerine CIA ekleme işlemi tekrarlanmış ve 10 dakika oda sıcaklığında arada bir sallanarak bekletilmiştir.
- 8) Oda sıcaklığında bekletilmiş olan tüpler daha sonra 10000 x g de 10 dakikalık santrifüj edilmiştir.
- 9) Santrifüj sonrası oluşan üst faz temiz bir tüpe alınmış ve alınan miktar kadar üzerine izoproponal (2-proponal) eklenmiştir.
- 10) Her bir tüpe isoproponal ve süpernatant'ın toplam hacminin 1/20'si kadar 5 M NaCl eklenmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmesinin ardından 5000 x g de 5 dakika santrifüj edilmesiyle nükleik asit çökeltisi tüpün tabanında toplanmış ve üst faz dikkatlice uzaklaştırılmıştır.
- 11) DNA pelleti üzerine 390 µL TE çözeltisi [(10 mM Tris ve 1 mM EDTA, pH 8.0)] ilave edilerek çözülmüştür. Nükleik asit çözeltisinde bulun RNA molekülleri 10 µg RNaz eklenmiş birkaç dakika vortekslemenin ardından 37°C'de 30 dakika süreyle inkübe edilerek uzaklaştırılmıştır.
- 12) Bu sürenin sonunda 40 µL 3 M sodyum asetat (NaOAc) eklenmiştir. Daha sonra bu karışıma 3 mL etanol eklenerek DNA çökertilmiş ve çökertilen DNA 5000 x g de 5 dakika santrifüj edilmesiyle tüpün tabanında tutulmuştur.
- 13) Süpernatant dikkatlice dökülmüş ve pellet 0.75 ml %80 etanol ile yıkanmış ve 5000 x g de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır.
- 14) Süpernatant dökülmüş ve tüpler temiz bir kağıt havlu üzerinde ters çevrilerek etanol kalıntısı uzaklaşmaya denk kuruması beklenmiştir.
- 15) Son olarak DNA pelleti 0.2 mL pH 8.0 TE' de çözülmüştür. Örnekler ileriki çalışmalara kadar +4°C'de veya derin dondurucuda bekletilmiştir.

3.3. DNA Kalitesi ve Miktarının Belirlenmesi

Ekstraksiyonu tamamlanarak domates örneklerinden elde edilen DNA'nın miktar ve kalitesi spektrofotometrik ve agaroz jel elektroforez yöntemleriyle belirlenmiştir.

3.3.1. Spektrofotometrik yöntem

Ekstraksiyonu tamamlanan DNA'nın kantite ve kalitesi belirlenmesi için spektrofotometrik yöntemde 50 kat seyreltilmiş olan toplam DNA'nın analizinde absorbansı 190 nm ile 1100 nm arasında tam tarama yapılmış ve ayrıca A₂₃₀, A₂₆₀ ve A₂₈₀ değerleri üzerinden DNA konsantrasyonu, polisakkarit varlığı, kimyasal kalıntı varlığı araştırılmıştır (Karaca vd 2005). Nükleik asit miktar tayini aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir. Formülde nükleik asitler için miktar tayini yapılırken A₂₆₀ nm'de nükleik asit absorbans değeriyle, deoksiribonükleik asidin varoluş katsayısının (ϵ) (DNA için 50) ve çözeltinin seyreltme faktörünün çarpımıyla nükleik asit miktarı mililitrede mikrogram olarak hesaplanmıştır.

$$\text{DNA}(\mu\text{g} / \text{ml}) = \text{A}(260) * \text{SF} * \epsilon$$

3.3.2. Agaroz jel elektroforez yöntemi

Agaroz jel elektroforez yöntemiyle RNA kontaminasyonu, polisakkarit varlığı ve yüksek moleküler ağırlıktaki DNA'nın varlığı araştırılmıştır. Ekstraksiyonu tamamlanmış olan DNA'nın kantite ve kalitesinin TRIS-Borik asit EDTA (TBE) agaroz jel elektroforez yöntemi ile belirlenmesi için %1.2'lik agaroz jel, 1X TBE çözeltisi (89 mM TRIS-HCl, 89 mM borik asit, 2 mM EDTA, pH 8.0) kullanılarak hazırlanmıştır. Jel içerisine 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonda olacak şekilde ethidium bromit 10 mg/ml ethidium bromit stoku kullanılarak ilave edilmiştir.

DNA örneklerinden 1 μg hazırlanmış ve 1/6 örnek hacmi olacak şekilde 6X yükleme çözeltisi [(‘loading dye’, Amresco), 50 mM TRIS-HCl, (pH 7.6), 0.025 mg bromofenol blue (‘bromophenol blue’), 6.45 M gliserol (‘glycerol’)] ile karıştırılmıştır. DNA örnekleri jel kuyucuklarına yüklenmiş ve 1X TBE çözeltisi kullanılarak 5 V/cm uygulanmış ve 110 dakika süre ile yürütülmüştür. Elektroforez

işleminde sonra DNA ultra viole (UV) transilluminator aracılığıyla görüntülenmiş UVpro yazılım programıyla bilgisayar ortamında kaydedilmiştir.

3.4. Hastalıklara Dayanıklılık Teşhis ve Kalite Özellikleri Kitlerinin Geliştirilmesi

Her bir hastalık veya kalite özelliği için PZR tamamlandıktan sonra ayrı ayrı agaroz jel elektroforesiz işlemleri gerçekleştirilerek her bir lokusun büyüklüğü (baz çifti) belirlenmiştir. Homozigot dominant, homozigot resesif ve heterozigot allellerine ait markır büyüklükleride yine aynı şekilde belirlenmiştir. Birden fazla hastalık veya kalite özelliğinin homozigot dominant, homozigot resesif ve heterozigot allellerinin tek bir PZR içerisinde (multipleks) belirlenmesi için primer çiftleri, allel büyüklükleri ayrı ayrı analiz edilerek optimum primer ve lokus sayıları belirlenmiştir. Bu çalışmalarda en fazla lokusun en kısa ve en etkin bir şekilde karakterizasyonu için çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR)

Çalışmada lokusların çoğaltılması işlemi için 120 nanogram genomik DNA, 0.5 µM uygun primer çifti, 80 mM Tris-HCl (pH 8.8), 19 mM (NH₄)₂SO₄ (pH 8.8), %0.009 Tween-20 (g/h), 0.28 mM her bir dNTP, 3 mM MgCl₂ ve 2 ünite *Taq* DNA polimeraz enzimi kullanılarak 25 µl reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir (İnce 2010). PZR çalışmalarında Çizelge 3.1 verilen toplam 32 çift primer kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan primer çiftleri

Lokus	5'→3' Sekansı	Tm*	MA**
APS_F	GGAACGTGGGTAGCATATGA	57.3	6246
APS_F1	GGCAGGAGAATATGCCAAAA	55.3	6208
APS_R	GCCAATGCTCATCAATGTGA	55.3	6101
APS_R1	CGTTCCATTCTCAACCCATT	55.3	5963
BK_F1	CTACCGGCACCGGCAAATCAATCA	64.4	7276
BK_F2	CAACCCACACTAGGCAAGTCGGGT	66.1	7332
BK_F3	TGGAAGTCCAAGCCCTAATCAC	60.3	6688
BK_R1	CTACCGGCACTTATTCGACTATCA	61.0	7248
BK_R2	CAACCCACACCCCATTTTTTTA	56.5	6549
BK_R3	CAACCCACACCCCATTTTTTTA	56.5	6549
C8B_F	TACCCACGCCCCATCAATG	58.8	5678
C8B_R	TGCAAGAGGGTGAATATTGAGTGC	61.0	7497
CR_F	CTTCTAGTAGTCCAACAGCAACTG	61.0	7297
CR_R	CACTTGGTTGATGGATAGTG	58.0	6203
FLUV_F	CATACAACCCAATGCAAGCC	57.3	6024

Çizelge 3.1. Devamı

Lokus	5'→3' Sekansı	Tm*	MA**
FLUV_R	CCAGGATGTCCAACCGACG	61.0	5783
FUS_F	GTCCCCACCTACTTACGA	56.0	5380
FUS_F1	GGGTAAACCAATCTTCCTT	52.4	5763
FUS_F2	GGGCTCCTAATCCGTGCTTCA	61.8	6373
FUS_R	CCGCAATCAGGTGTCCA	55.2	5155
FUS_R1	CCGACTGTGGTAAATCTG	53.7	5515
FUS_R2	GGTGGAGGATCGGGTTTGTTTC	62.1	6868
I2_F	CAAGGAAGTGCCTGTCTG	62.0	6133
I2_R	ATGAGCAATTTGTGGCCAGT	58.0	6172
MI_F	AGAACAATAGAATCTCTCTTG	52.0	6413
MI_R	CTTCAGGAACCCCTCAGC	58.2	5405
OL1_F1	TCCGTGCTGAATGAAGATTCAAAC	59.3	7361
OL1_F2	GGTTGGAGACGAATGGAAAGATGC	62.7	7531
OL1_F3	GCTTCTAGATGCAGAAAGTTGGCG	62.7	7483
OL1_F4	TGGGATCACAGATTAACAAATGCG	59.3	7410
OL1_F5	CAAACAAAGCAGTGGATTTTTTTTCG	58.1	7680
OL1_R1	TCCGTGCTGATAAACTGTTAGAC	59.3	7352
OL1_R2	GGTTGGAGACAATAGACTCGAGAT	61.0	7466
OL1_R3	CGCCATTCCCGCATATACAG	61.8	6311
OL1_R4	ATGTGTGCGATGAGAAACGTGG	60.3	6880
OL1_R5	TAAAAGCCTTAGTGGGACAGGGC	62.4	7138
PVR4_F	CGAAGAGAGAAGGTC	47.8	4675
PVR4_R	TCAGGGTAGGTTATT	42.4	4638
REX1_F1	TCGGAGCCTTGGTCTGAATT	57.3	6139
REX1_R1	GCCAGAGATGATTCGTGAGA	57.3	6202
TM1_F	CAGCTCACGAACATTGAAGTTGAT	68.0	7361
TM1_R	CAGCTCACGATAATCATTAAATTG	64.0	7320
TMV_F1	CCTTGACGCAGATAATGTGATGTC	61.0	7368
TMV_F2	GGTGACTGTGTAATTATGTTGTGC	59.3	7445
TMV_F3	CTGACGTCACCTTGTGGTCTTTA	61.0	7301
TMV_F4	AGGGCCGTCTACGTGTGTTGAAT	62.7	7415
TMV_F5	TGCCAGCCTAATTGTCCTAGGC	66.1	7265
TMV_F6	AGCGTCACTCCATACTTGAATAA	59.3	7321
TMV_R1	CCTTGACGCATTGAAAGAAATCAA	57.6	7354
TMV_R2	GGTGACTGTGGTGGAAAATGCAAA	61.0	7506
TMV_R3	CTGACGTCACCTTAGCTTTGTAAAC	59.3	7303
TMV_R4	AGGGCCGTCTATTGGATCAGAGAA	62.7	7442
TMV_R5	TGCCAGCCTTGGAAAAAAAAGAT	59.3	7379
TMV_R6	AGCGTCACTCAAAATGTACCCAAA	59.3	7299
ToMV_F	CACCTTTCCCTCTCCAA	52.8	5001
ToMV_R	CACCTTTCCCCTAAAGC	52.8	5050
TSWV_F	GTGCCAGAGGAGGATTTAT	56.0	5908
TSWV_R	GCGAGGTGGACACTGATACT	62.0	6182
TY1_F	AACCATTATCCGGTTCCTC	55.3	6012
TY1_R	TTTCATTCTTGTCTCTCTG	54.0	6295
Ve_Dom_F	AAGTTTCTTATTTTCCCTTCTCC	53.5	6896
Ve_Dom_R	CTCTTAGGATTTTGTGACGTGATA	55.3	7060
Ve_F	CCATGAACAGATGTGACTTGTGTG	61.0	7408
Ve_R	CGATAACAACCAACTCTCTGTCTC	61.0	7217

Tm*: Erime Sıcaklığı, MA**: Moleküler ağırlık

Polimeraz zincir reaksiyonları için üç farklı PZR profili (A, B ve C) kullanılmıştır. Profiller Çizelge 3.2, 3.3 ve 3.4’de gösterilmiştir. Profillerde 94°C’de 3 dakika bekletilen tüpler önce 10 döngülük ön-PZR’de denatürasyon için 94°C’de 30 saniye, primer bağlanması için 55°C’de (Çizelge 3.2), 60°C’de (Çizelge 3.3) veya 65°C’de (Çizelge 3.4) 30 saniye ve sentezleme 72°C’de 1 dakikada gerçekleştirilmiştir.

Ön-PZR profilinin primer bağlanma sıcaklığı döngü başına 0.5°C azaltılarak gerçekleştirilmiştir. Otuz döngülük ikinci PZR profilinde ise ön-PZR döngüsüne ait verileri kullanılmış ancak primer bağlanma sıcaklığı (T_a) 50°C, 55°C veya 60°C olarak sabitlenmiş ve son döngüden sonra reaksiyon 72°C’de 8 dakika bekletilerek ve blok sıcaklığı 5°C indirilerek örneklerin termal döngü cihazından alınmasına kadar bekletilmiştir (İnce 2010).

Çizelge 3.2. PZR Profil A (İnce 2010)

	PZR Profili	Zaman	Döngü Sayısı	Aşama
Hot Start	94°C	3 dakika	1 döngü	Ön-denatürasyon
Ön PZR	94°C	20 saniye	10 döngü	Denatürasyon
	55°C→50°C	30 saniye		Renatürasyon
	72°C	1 dakika		Sentez
PZR	94°C	20 saniye	30 döngü	Denatürasyon
	61°C	30 saniye		Renatürasyon
	72°C	1 dakika		Sentez
Final	72°C	10 dakika	1 döngü	Final Sentez
	5°C	Sonsuz		

Çizelge 3.3. PZR Profil B (İnce 2010)

	PZR Profili	Zaman	Döngü Sayısı	Aşama
Hot Start	94°C	3 dakika	1 döngü	Ön-denatürasyon
Ön PZR	94°C	20 saniye	10 döngü	Denatürasyon
	60°C→55°C	30 saniye		Renatürasyon
	72°C	1 dakika		Sentez
PZR	94°C	20 saniye	30 döngü	Denatürasyon
	55°C	30 saniye		Renatürasyon
	72°C	1 dakika		Sentez
Final	72°C	10 dakika	1 döngü	Final Sentez
	5°C	Sonsuz		

Çizelge 3.4. PZR Profil C (İnce 2010)

	PZR Profili	Zaman	Döngü Sayısı	Aşama
Hot Start	94°C	3 dakika	1 döngü	Ön-denatürasyon
Ön PZR	94°C	20 saniye	10 döngü	Denatürasyon
	65°C→60°C	30 saniye		Renatürasyon
	72°C	1 dakika		Sentez
PZR	94°C	20 saniye	30 döngü	Denatürasyon
	55°C	30 saniye		Renatürasyon
	72°C	1 dakika		Sentez
Final	72°C	10 dakika	1 döngü	Final Sentez
	5°C	Sonsuz		

Çalışmada 25 µL PZR ürününe 5 µL yükleme çözeltisi (%0.25 (g/h) bromophenol blue, %0.25 (g/h), xylene cyanol FF ve %40 (g/h) sukroz) eklenmiş ve pipetle karıştırıldıktan sonra 15 µL miktarda, %2 veya 3.0 (g/h) oranında yüksek çözünürlüklü Serva agaroz içeren jellerdeki kuyucuklara yüklenmiştir.

Elektroforesis işleminde 5 V/cm, sabit amperde elektriksel akım uygulanmış ve en az 160 dakika 1X TRIS Borate EDTA [89 mM TRIS, 89 mM borate, 2 mM EDTA (pH 8)] çözeltisinde yürütülmüştür. Elektroforesis işlemi sırasında PZR ürünleri jel içerisinde bulunan 0.5 µg/mL ethidium bromit çözeltisiyle etiketlendikten sonra UV transilluminator yardımıyla görüntülenmiş ve UVpro yazılım programı yardımı ile bilgisayara aktarılmıştır.

3.6. SCAR Markırlarının Oluşturulması

Çalışmada kullanılan lokuslara ait PZR analizlerinden yola çıkarak daha önceki çalışmalarda ‘Sequence Characterized Amplified Region’ (SCAR) markırı olarak belirtilen ve multipleks PZR’de kullanılabilen SCAR markırları diğer SCAR markırları ile uyumluluğu durumunda SCAR olarak kullanılmış aksi durumda ise değişik restriksiyon enzimleri ile kesilerek CAPS markırlarına dönüştürülmüştür.

3.7. CAPS Markırlarının Oluşturulması

Çalışmada kullanılacak lokuslara ait daha önceden belirlenmiş olan ‘Cleaved Amplified Polymorphic Sequence’ (CAPS) markırları multipleks CAPS tanı kitine uygun olanlar kit içerisine dahil edilmiş, SCAR olarak multipleks PZR’ye uygun olmayan markırlar CAPS markır sistemine veya CAPS markırlarının multiplekse uyması açısından yeni restriksiyon enzimleri kullanılarak yeni CAPS markırlarına dönüşümü sağlanmıştır.

Çalışmada kullanılan lokuslardan CAPS analizine alınacak olanlara ait restriksiyon enzimler (*Taq* I, *Rsa* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Hind* III) ilgili literatürde belirtilen protokollere göre 10 µL’lik reaksiyon hacminde ve 5 µL PZR ü rünü, 1 µL 10X reaksiyon solüsyonu, 6 ünite restriksiyon enzimi kullanılarak 65°C veya 37°C de 30 veya 60 dk sürede inkübe edilerek restriksiyon enzim çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Daha sonra ü rünler yukarıda belirtildiği gibi agaroz jel elektroforesis işlemine tabi tutulmuştur.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Bitki Materyali

Çalışmada kullanılan bitki materyalleri 8 ticari hibrit (Vuslat F₁, Orient F₁, Pegasus F₁, Tayfun F₁, Victory F₁, Bestona F₁, Azra F₁ ve Reyhan F₁) domates çeşidi ile 40 adet F₂ hattından oluşturmuştur. Çizelge 4.1’de kullanılan bu ticari çeşitlerin bazı hastalık veya zararlılara olan dayanılıkları ile ilgili özellikleri gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan hibritlerin kit oluşturmada kullanılacak bütün lokusları içermemesi veya hastalıklara dayanıklılıkları ve kalite özelliklerine ilişkin verilerin olmaması nedeni ile değişik F₂ bitkilerinden de DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Farklı F₂ bitkilerinin çalışmaya eklenmesi ile lokusun homozigot dominant (örneğin *MiMi*), homozigot resesif (örneğin *mimi*) veya heterozigot (örneğin *Mimi*) durumları belirlenerek oluşturulmuş kitlerin etkinliği ve doğruluğu teyit edilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan hibrit çeşitler ve özellikleri

Domates çeşitleri	Gen Adı			
	<i>Ty-1</i>	<i>I2</i>	<i>Mi</i>	<i>Sw-5</i>
Vuslat F ₁	TYLCV	-	-	-
Orient F ₁	TYLCV	Fusarium	Nematod	-
Pegasus F ₁	-	-	Nematod	-
Tayfun F ₁	TYLCV	Fusarium	Nematod	TSWV
Victory F ₁	TYLCV	Fusarium	Nematod	TSWV
Bestona F ₁	TYLCV	Fusarium	Nematod	-
Azra F ₁	TYLCV	-	-	-
Reyhan F ₁	TYLCV	Fusarium	-	-

Domates lekeli solgunluk virüsü hastalığına dayanıklılık *Sw-5*, Fusarium solgunluğuna dayanıklılık *I2*, domates sarı yaprak kıvrıcıklığı hastalığına dayanıklılık *Ty-1*, kök-ur nematoduna dayanıklılık *Mi*.

4.2. DNA Ekstraksiyonu

DNA çalışmalarının en basit ancak en önemli aşamalarının başında kaliteli ve yeterli miktarda DNA elde edilmesi gelmektedir. Tez çalışmasında kullanılan tüm bitkilerden genomik DNA izolasyonu Karaca vd (2005) tarafından geliştirilmiş olan methoda göre gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Bitkilerden DNA izolasyonu ve agaroz jel elektroforesis çalışmaları. Şekilde a: yaprak örneklerine PVPP eklenmesi, b: sıvı azot ile ezme işlemi, c ve d: ezilen yaprak örneklerinin tüpleri ve transferi, e ve f agaroz jelinin tüplere yüklenmesi gerçekleştirilmesi gösterilmiştir.

4.3. Spektrofotometrik Yöntemle DNA Kalite ve Miktarının Belirlenmesi

Spektrofotometrik yöntemde DNA kalite ve miktarları Beer-Lambert yasasına dayanılarak seyreltilen nükleik asit çözeltisinin UV absorbansından (A_{230} , A_{260} ve A_{280}) yararlanılarak belirlenmiştir. Nükleik asit miktarı 260 nm dalga boyunda nükleik asit absorbans değeriyle, DNA varoluş katsayısının (ϵ) (DNA için 50 $\mu\text{g/mL}$) ve çözeltinin seyreltme faktörünün çarpımıyla belirlenmiştir.

İyi bir DNA ekstraksiyonunun ilk göstergesi elde edilen nükleik asit miktarı olsa da bunun yanında elde edilen DNA'nın her türlü pigment maddesi, polisakkarit, protein, kimyasal kalıntı gibi maddelerden de temiz olması gereklidir (İnce vd 2009). DNA kalitesinin iyi bir şekilde ortaya konması için tüm dalga boylarında taramanın yapılması gerekmektedir. Ancak pratikte bütün dalga boyları yerine genellikle 550 nm ile 650 nm dalga boyu arası bazı renk pigment maddeleri, 280 nm'de proteinler, 260 nm'de nükleik asitler, 230 nm'de polisakkaritlerin varlığı değerlendirilmektedir. Çalışmada 190 nm ile 1100 nm dalga boyları arasında ölçümler yapılmıştır.

Kaliteli bir DNA'nın göstergesi elde edilen 260 nm, 280 nm ve 230 nm absorbans değerlerinin birbirlerine oranı olarak bilinmektedir. Kaliteli bir DNA'nın 260/280 oranı 1.6 ve üzeri değerde olması gerekirken 260/230 oranının en az 1.0 ve üzeri değerde olması gerekmektedir (Karaca vd 2005). Çalışmada kullanılan örneklerden elde edilen DNA'ların kalite ve miktarları Çizelge 4.2'de verilmiştir. Çizelge 4.2'nin incelenmesi ile görüleceği üzere kullanılan bütün domates örneklerine ait DNA'ların spektrofotometrik değerler oldukça iyidir. İyilik kavramı yüksek oranlı 260/280 ve 260/230 oranlarından anlaşılmaktadır. Bu oranlardan 260/280 yüksekliği protein kalıntısının olmadığını ve DNA'ların proteinlerden arı olduğunu gösterirken yüksek 260/230 oranı polisakkaritlerin etkin bir şekilde uzaklaştırılmış olduğunu göstermektedir (Karaca vd 2005). Çalışmada kullanılacak domates örneklerinden elde edilen genomik DNA'ların büyük bir bölümünün 260/280 oranları 1.8'in üzerinde okuma değerine sahip olmuştur. Bu oranların yüksekliği kullanılan ekstraksiyon metodunun gücünü ortaya koyarak genomik DNA tabanlı yapılacak her türlü analiz için kullanılabilir DNA'lar olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan domateslere ait genomik DNA'ların spektrofotometrik ölçüm değerleri

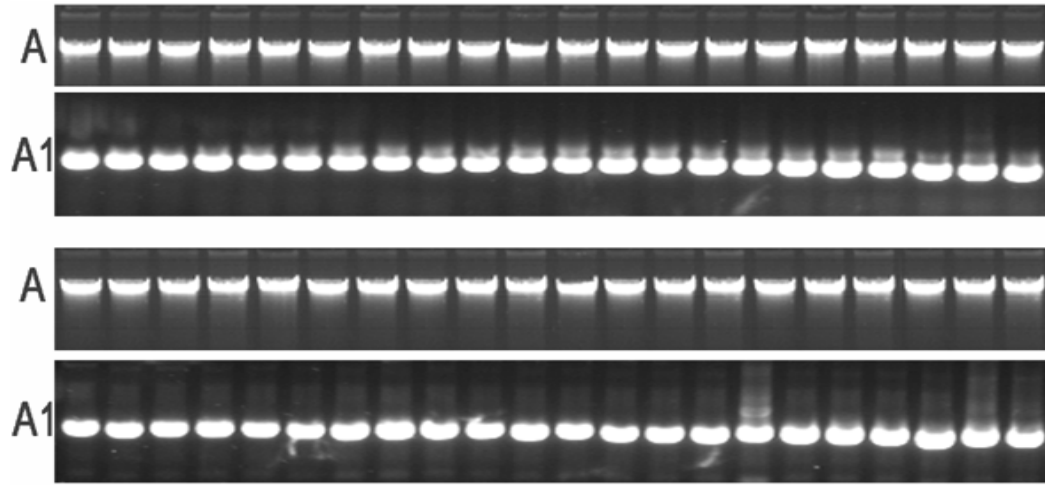
Örnek Adı	A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	A ₂₆₀ /280
Vuslat F ₁	0.11	0.15	0.09	1.36	1.74
Orient F ₁	0.04	0.08	0.04	1.79	1.83
Pegasus F ₁	0.10	0.17	0.09	1.71	1.82
Tayfun F ₁	0.07	0.14	0.08	1.96	1.85
Victory F ₁	0.04	0.08	0.04	1.90	1.85
Bestona F ₁	0.02	0.04	0.02	1.75	2.00
Azra F ₁	0.04	0.08	0.04	1.95	1.90
Reyhan F ₁	0.33	0.39	0.25	1.19	1.59
Vuslat F ₁ (bulk)	0.09	0.12	0.07	1.42	1.77
Orient F ₁ (bulk)	0.08	0.13	0.07	1.71	1.83
Pegasus F ₁ (bulk)	0.09	0.17	0.09	1.99	1.92
Tayfun F ₁ (bulk)	0.32	0.48	0.28	1.50	1.72
Victory F ₁ (bulk)	0.04	0.06	0.03	1.73	1.88
Bestona F ₁ (bulk)	0.04	0.07	0.04	2.03	1.87
Azra F ₁ (bulk)	0.19	0.31	0.17	1.63	1.78
Reyhan F ₁ (bulk)	0.29	0.37	0.22	1.28	1.66
F2_2666	0.06	0.07	0.04	1.15	1.89
F2_2255	0.03	0.03	0.02	1.13	1.89
F2_2243	0.04	0.07	0.03	1.55	1.91
F2_1494	0.02	0.03	0.02	1.30	2.00
F2_2899	0.05	0.08	0.04	1.41	1.90
F2_1237	0.32	0.74	0.37	2.27	1.99
F2_1239	0.40	0.96	0.49	2.38	1.96
F2_1314	0.29	0.67	0.35	2.34	1.93
F2_1335	0.24	0.55	0.28	2.28	1.94
F2_1340	0.21	0.46	0.24	2.22	1.95
F2_1342	0.47	1.08	0.56	2.30	1.92
F2_1360	0.25	0.59	0.30	2.37	1.96
F2_1363	0.31	0.65	0.34	2.11	1.93
F2_1364	0.39	0.94	0.48	2.40	1.95
F2_1370	0.29	0.65	0.33	2.22	1.97
F2_1380	0.24	0.56	0.28	2.33	1.97
F2_1456	0.18	0.39	0.20	2.19	1.94
F2_1470	0.18	0.37	0.19	2.10	1.96
F2_1477	0.25	0.59	0.30	2.33	1.98
F2_1481	0.29	0.70	0.36	2.40	1.96
F2_1531	0.13	0.24	0.12	1.88	1.98
F2_1540	0.19	0.41	0.20	2.18	1.99
F2_1543	0.16	0.29	0.16	1.85	1.90
F2_1565	0.10	0.20	0.10	1.98	1.94
F2_1581	0.13	0.22	0.11	1.69	1.96
F2_1583	0.10	0.19	0.10	1.93	1.97
F2_1584	0.16	0.33	0.17	2.02	1.94
F2_1657	0.64	1.41	0.74	2.22	1.91
F2_1670	0.19	0.38	0.19	1.98	1.94
F2_1671	0.10	0.13	0.07	1.27	1.97

Çizelge 4.2. Devamı

Örnek Adı	A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	A ₂₆₀ /280
F2_1701	0.12	0.23	0.12	1.99	1.99
F2_1709	0.08	0.15	0.07	1.87	1.97
F2_1713	0.22	0.40	0.21	1.84	1.91
F2_1815	0.14	0.30	0.15	2.06	1.97
F2_1819	0.09	0.17	0.09	1.82	1.95
F2_1921	0.15	0.30	0.16	1.99	1.96
F2_1957	0.26	0.51	0.27	1.93	1.91
F2_1964	0.64	1.42	0.77	2.22	1.84

4.4. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi

Genomik DNA'nın kalitesi ve kantitesini gösteren önemli bir araç olan spektrofotometrik ölçümler her ne kadar saflık, temizlik gibi kalite unsurları hatta miktar tayini gibi niceleyici özellikler hakkında bilgi verici düzeyde olsa da spektrofotometrik değerlerin araştırıcıya elde edilen DNA veya RNA'nın bir bütün halinde bulunup bulunmadığı veya RNA kontaminasyonlarının bulunup bulunmaması hakkında bilgi verememektedir (İnce 2010). Bu bilgiye ulaşmak için agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılarak çalışmada kullanılan DNA'lar incelenmiş ve DNA'ların bir kalıntı içermediği her türlü analiz için uygun olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.2'de gösterildiği üzere izole edilmiş DNA'lar RNA ve polisakkarit içermemekte ve bir bütün halindedir. Elde edilen DNA'ların PZR çalışmaları için uygunluğu *Mi* genine ait primer çifti (REX_FR) kullanılarak teyit edilmiştir.

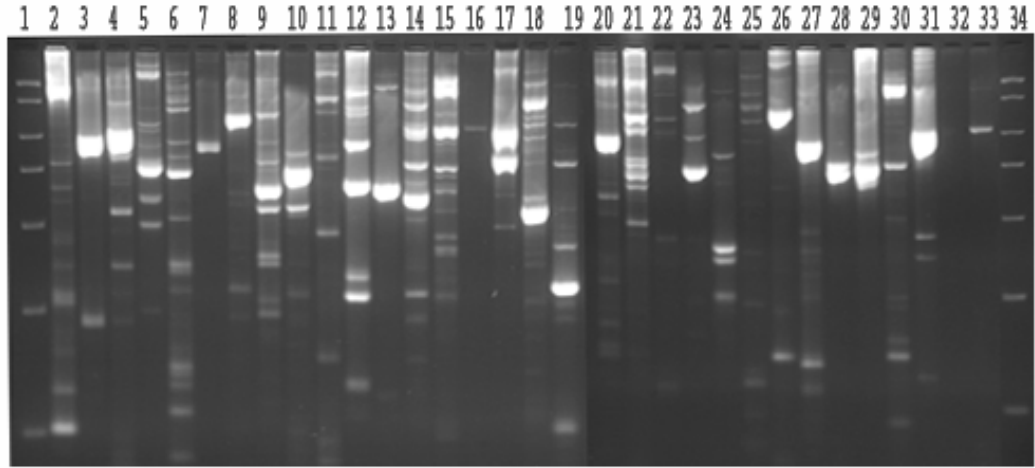


Şekil 4.2. Genomik DNA'lar ve bu DNA'ların PZR çalışmasının agaroz jel elektroforez yöntemi ile teyidi. A: genomik DNA profilleri ve A1: PZR amplifikasyon profilleri.

4.6. Lokusların PZR Profillerinin Belirlenmesi

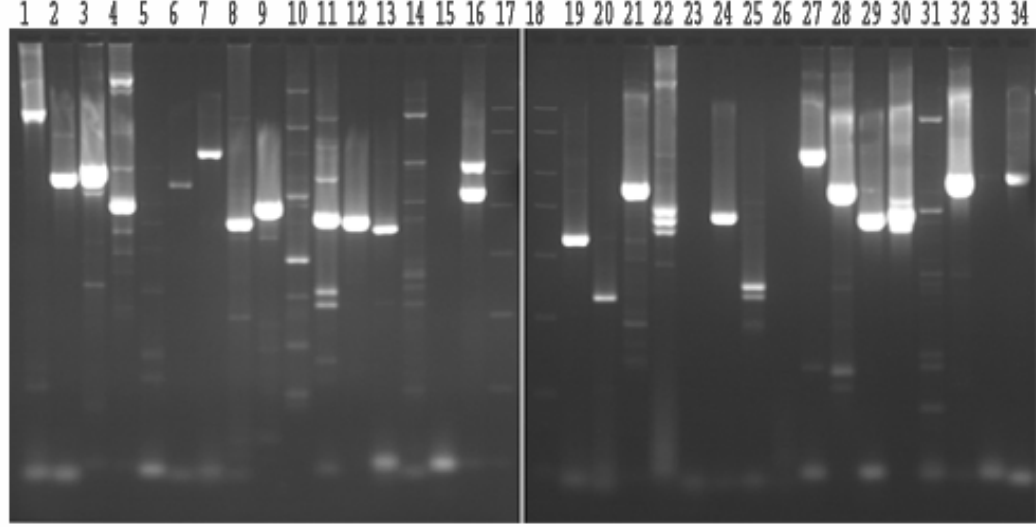
Çalışmada kullanılan değişik hastalık ve kalite kriterlerine özgü markırlara ait primer çiftlerinin en uygun bağlanma sıcaklıklarını (T_a) belirlemek amacı ile 3 farklı PZR profili kullanılmıştır. Profil A olarak isimlendirilen PZR çalışmalarında T_a sıcaklığı 50-55°C, profil B ise 55-60°C ve profil C 60-65°C olarak uygulanmış ve primer çiftleri için en uygun T_a sıcaklıkları araştırılmıştır (Şekil 4.3, 4.4 ve 4.5).

PZR çalışmalarında bağlanma sıcaklığının (T_a) belirli ölçülerde düşürülerek uygulandığı yöntem 'Touch-down' PZR olarak bilinmektedir. Bu yöntem gradient PZR uygulamasına gerek duymadan birden fazla primer çiftinin aynı PZR tüpü ve profilin de kullanılmasına izin vermekte ve sonuçların daha güvenilir bir şekilde elde edilmesini sağlayabilmektedir (İnce 2010). Gradient PZR çalışmaları gradient özelliği olan termal döngü cihazlarında kullanılarak her hangi bir primer çiftinin en etkin olduğu bağlanma sıcaklığını belirleyen bir yaklaşımdır.



Şekil 4.3. PZR profili A ile çoğaltılan lokuslar. Şekildeki numaralar 1'den 34 kadar sırasıyla (1) DNA büyüklük markırı, (2) APS_FR, (3) APS_FR1, (4) BK_FR1, (5) BK_FR2, (6) BK_FR3, (7) TY1_FR, (8) CR_FR, (9) FLUV_FR, (10) OL1_FR1, (11) OL1_FR2, (12) OL1_FR3, (13) OL1_FR4, (14) OL1_FR5, (15) TSWV_FR, (16) TM1_FR, (17) ToMV_FR, (18) FUS_FR, (19) FUS_FR1, (20) FUS_FR2, (21) I2_FR, (22) MI_FR, (23) REX_FR, (24) C8B_FR, (25) PVR4_FR, (26) TMV_FR1, (27) TMV_FR2, (28) TMV_FR3, (29) TMV_FR4, (30) TMV_FR5, (31) TMV_FR6, (32) VE_D_FR, (33) VE_FR ve (34) DNA büyüklük markırı gösterilmiştir. DNA büyüklük markırı yukarıdan aşağıya sırasıyla 2000, 1500, 750, 500, 300, 150 ve 50 baz çiftinden oluşmaktadır.

Şekil 4.3'nin incelenmesi ile görüleceği üzere çoğu lokus T_a 55-60°C bağlanma sıcaklığında çok sayıda ampikon üretmiştir. Bu durum T_a 55-60°C'in çalışmada kullanılan lokusların çoğaltımı için uygun olmadığını göstermiştir. Bu profilde 32 nolu örnek VE_D_FR primer çifti ile hiçbir ürün alınmamıştır.

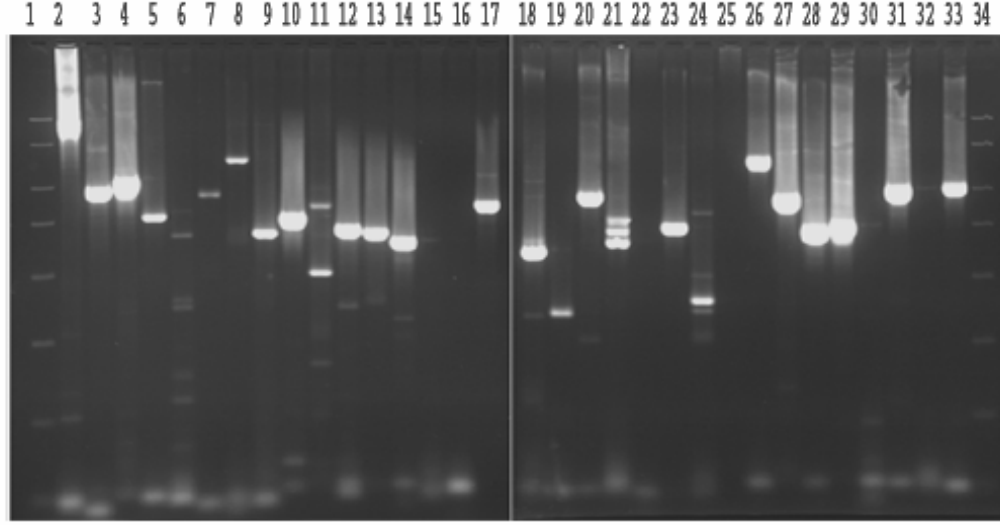


Şekil 4.4. PZR profili B ile çoğaltılan lokuslar. (1) APS-FR, (2) APS-FR1, (3) BK_FR1, (4) BK_FR2, (5) BK_FR3, (6) TY1_FR, (7) CR_FR, (8) FLÜV_FR, (9) OL1_FR1, (10) OL1_FR2, (11) OL1_FR3, (12) OL1_FR4, (13) OL1_FR5, (14) TSWV_FR, (15) TM1_FR, (16) ToMV_FR, (17) DNA büyüklük markırı, (18) DNA büyüklük markırı, (19) FUS_FR, (20) FUS_FR1, (21) FUS_FR2, (22) I2_FR, (23) MI_FR, (24) REX_FR, (25) C8B_FR, (26) PVR4_FR, (27) TMV_FR1, (28) TMV_FR2, (29) TMV_FR3, (30) TMV_FR4, (31) TMV_FR5, (32) TMV_FR6, (33) VE_D_FR ve (34) VE_FR gösterilmiştir. DNA büyüklük markırı yukarıdan aşağıya sırasıyla 2000, 1500, 750, 500, 300, 150 ve 50 baz çiftinden oluşmaktadır.

Şekil 4.4 gösterilen PZR profili B uygulamasından elde edilen ampikonlar gösterilmektedir. Bu profilde profil A'ya oranla spesifik olmayan ampikonların büyük oranda ortadan kalktığı tespit edilmiştir. Ancak 33 (VE_D_FR) nolu lokusun profil A da olduğu gibi bu profilde de çalışmadığı gözlenmiştir. Bunun nedeni büyük bir ihtimalle primer sentezi sırasında yaşanan bir sorun olabileceği gibi bu primer çiftinin *Verticillium dahliae* için doğru bir primer çifti olmadığı görülmüştür. Bu çalışmada *Ve* dayanıklılık markırı olarak VE_D_FR primer çifti ile VE_FR primer çifti kullanılması planlanmasına rağmen VE_D_FR primer çifti çalışmadığı için

VE_FR primer çifti *Ve* dayanıklılık markırı olarak kullanılmıştır. VE_FR markırının PZR profili A ve B’de çalıştığı saptanmıştır.

PZR B profilinde 5, 15, 23 ve 26 nolu örnekler sırasıyla BK_FR3, TM1_FR, C8B_FR, ve TMV_FR2 nolu primer çiftlerinin bu profilde çalışmadığı gözlenmiştir. Bu lokusların PZR A profiline uygun olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.5. PZR profili C ile çoğaltılan lokuslar. Şekildeki numaralar 1’den 34 kadar sırasıyla (1) DNA büyüklük markırı, (2) APS_FR, (3) APS_FR1, (4) BK_FR1, (5) BK_FR2, (6) BK_FR3, (7) TY1_FR, (8) CR_FR, (9) FLUV_FR, (10) OL1_FR1, (11) OL1_FR2, (12) OL1_FR3, (13) OL1_FR4, (14) OL1_FR5, (15) TSWV_FR, (16) TM1_FR, (17) ToMV_FR, (18) FUS_FR, (19) FUS_FR1, (20) FUS_FR2, (21) I2_FR, (22) MI_FR, (23) REX_FR, (24) C8B_FR, (25) PVR4_FR, (26) TMV_FR1, (27) TMV_FR2, (28) TMV_FR3, (29) TMV_FR4, (30) TMV_FR5, (31) TMV_FR6, (32) VE_D_FR, (33) VE_FR ve (34) DNA büyüklük markırı gösterilmiştir. DNA büyüklük markırı yukarıdan aşağıya sırasıyla 2000, 1500, 750, 500, 300, 150 ve 50 baz çiftinden oluşmaktadır.

Çalışmanın diğer PZR profilinde alınan sonuçlar Şekil 4.5’de gösterilmektedir. Bu PZR profilinde (C) lokuslara ait primer çiftleri genellikle tek amplikon üretmişlerdir. Ancak ilgili şekilde de görüldüğü üzere 7, 8 ve 19 nolu örneklerin (TY1_FR, CR_FR, FUS_FR1) bu profilde oldukça zayıf amplikon ürettikleri ve dolayısıyla PZR B profiline uygun oldukları saptanmıştır (Şekil 4.5).

Çalışmada kullanılan bütün profiller birlikte incelendiğinde A profilinin çoğunlukla spesifik olmayan ampikonlar ürettiği, C profilinde ise bazı primer çiftlerinin zayıf ampikonlar oluşturduğu görülürken çoğu primer çiftinin B profilinde etkin çalıştığı saptanmıştır (Şekil 4.3, 4.4, 4.5). Bu durum PZR tabanlı moleküler araştırmalarda mutlaka ‘Touch-down’ veya ‘gradient’ PZR uygulamalarının her hangi bir markırın tekrarlanabilirliği ve tekrar üretilebilirliğini artırmak için kullanılması gerektiğini göstermektedir (İnce 2010).

4.7. Lokusların Uygun PZR Profillerinin Teyit Edilmesi

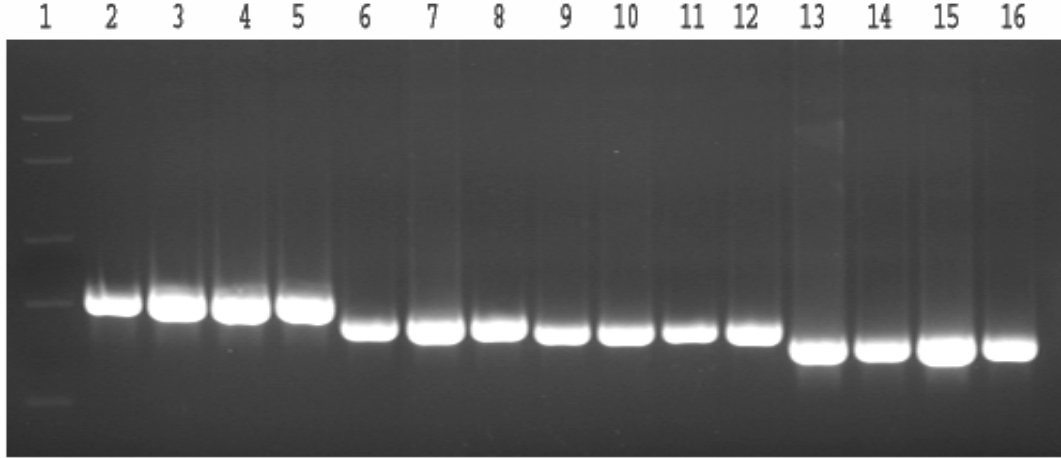
Ön taramaları üç değişik PZR profilinde [A (55→50°C), B (60→55°C) ve C (65→60°C)] tamamlanan lokuslara ait primer çiftleri hibrit çeşitleri ve hatlar üzerinde uygun PZR profilinde tekrar PZR çalışmaları gerçekleştirilerek tekrarlanabilirlikleri teyit edilmiştir. Tekrarlanabilirlik aynı örneklerle aynı termal döngü cihazında aynı sonuçların alınmasıdır. Tekrar üretilebilirlik ise farklı araştırmacıların farklı termal döngü cihazlarında aynı sonucu ulaşılması olarak bilinmektedir (Karaca vd 2008). Bu çalışmada alınan sonuçların Huang vd (2000) tarafından belirlenen sonuçlar ile aynı olması *Oidium lycopersicum*'a ait *Ol-1* dayanıklılık allelleri teşhisinde uygulanan yöntemin tekrar üretilebildiğini göstermiştir.

Oidium lycopersicum dayanıklılık markırlarından 5 farklı markır çalışmada kullanılmıştır. Şekil 4.6'da gösterildiği üzere *Oidium lycopersicum* allelleri aynı PZR profilinde ve aynı agaroz jel konsantrasyon ve elektroforesis sürelerinde ayrıştırılarak bir taraftan tekrarlanabilirlikleri belirlenmiş diğer taraftan da polimorfizm düzeyleri tespit edilmiştir.

Çalışmada Orient F₁, Pegasus F₁, Victory F₁ ve Bestona F₁ hibritleri kullanılarak *Oidium lycopersicum* dayanıklılık markırları araştırıldığında 5 farklı *Oidium lycopersicum* markırlarından 4'ü başarı ile üretilmiş bir markırın ise tekrar üretilebilirliği saptanamamıştır. *Oidium lycopersicum* dayanıklılık markırlarından 4'ü farklı boylarda ampikon oluşturmuşlardır (Şekil 4.6).

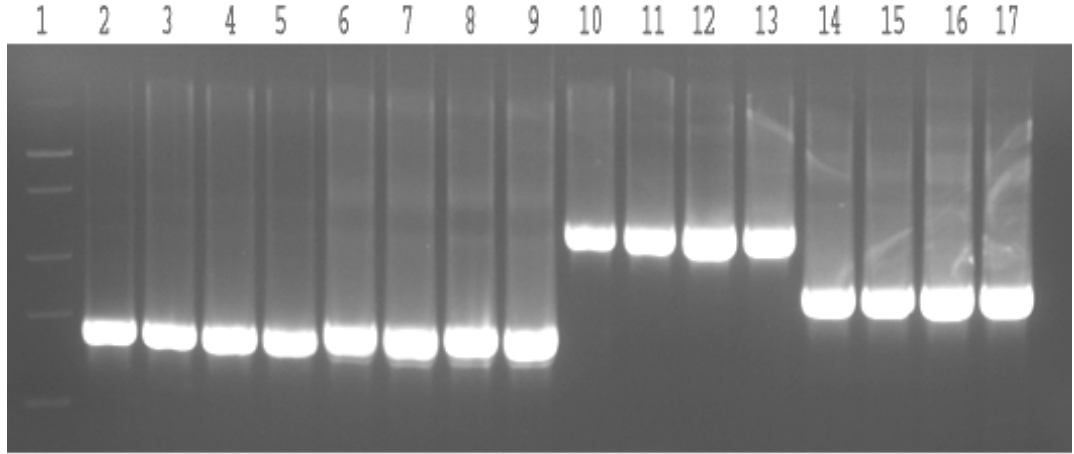
OL1_FR3 yaklaşık olarak 700 baz çifti uzunluğunda ampikon oluşturmakta ve bu ampikon dayanıklı çeşitlerde bulunurken OL1_FR4 primer çifti 680 baz

uzunluğunda markır üretmekte ve hassas genotiplerde bulunmaktadır (Huang vd 2000). Çalışmada hibrit çeşitlerle yapılan denemelerde her iki primer çifti amplikonlar oluşturmuş ve bu nedenle bu markırların *Ol-1* geninin teşhisinde doğrudan kullanılamayacağı belirlenmiştir. Bu çalışmada her iki primer çifti birleştirilerek (multipleks) *Oidium lycopersicum* dayanıklılık testi için bir CAPS markırı oluşturulması planlanmıştır.



Şekil 4.6. *Oidium lycopersicum* allelleri için uygun PZR profilinde lokusların teyit edilmesi. Şekilde 1 nolu örnek DNA büyüklük markırı olup 2000, 1500, 1000, 750 ve 500 baz çifti bantlarını göstermektedir. İki, 3, 4 ve 5 nolu kuyucuklarda bulunan örnekler Orient F₁, Pegasus F₁, Victory F₁ ve Bestona F₁ hibritlerine ait DNA örnekleri olup OL1_FR1 primer çifti ile çoğaltılmıştır. Örnek numarası 6, 7 ve 8 olan kuyucuklarda Orient F₁, Victory F₁ ve Bestona F₁ çeşitlerine ait DNA örnekleri OL1_FR3 primer çifti ile çoğaltılmıştır. Kuyucuk numarası 9 ile 10, 11 ve 12 nolu örnekler sırasıyla Orient F₁, Pegasus F₁, Victory F₁ ve Bestona F₁ hibritlerine ait DNA örnekleri olup OL1_FR4 primer çifti ile ,13, 14, 15 ile 16 örnekler sırasıyla Orient F₁, Pegasus F₁, Victory F₁ ve Bestona F₁ hibritlerine ait DNA örnekleri olup OL1_FR5 primer çiftleri ile çoğaltılmışlardır. Şekilde kullanılan PZR profili C olup PZR ürünleri %2 serva agaroz jelde 2.5 saat elektroforesis işlemi ile üretilmiştir.

Çalışmada diğer bir tanı kiti olarak domates mozaik virüsü (ToMV) hastalığının teşhisinde kullanılabilecek TMV_FR1, TMV_FR2, TMV_FR3, TMV_FR4 ve ToMV_FR primer çiftleri kullanılmıştır. Şekil 4.7'de gösterildiği üzere ToMV hastalığının teşhisinde kullanılmasını sağlamak amacıyla 4 farklı domates hibritine ait DNA örnekleri ToMV primer çiftleri kullanılarak PZR C profilinde çoğaltılmıştır.



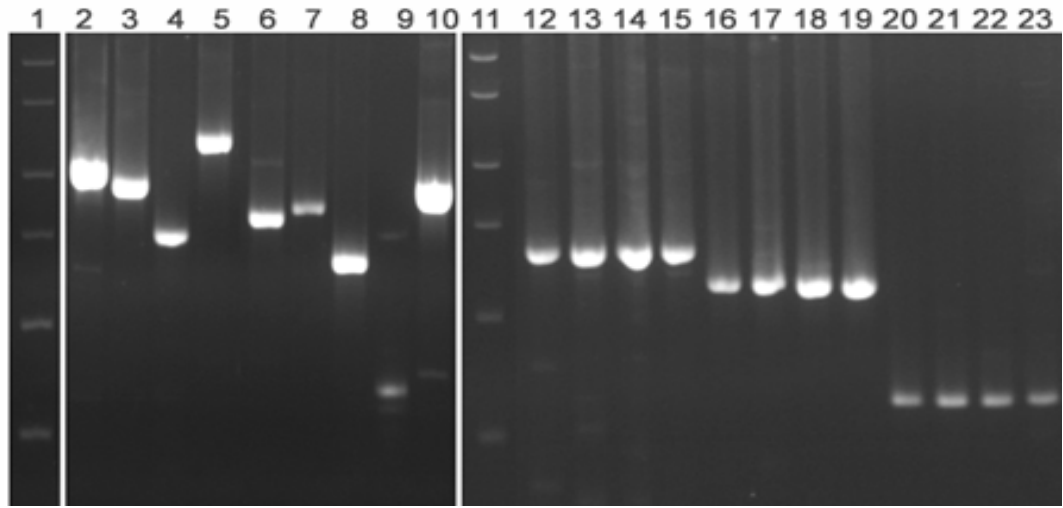
Şekil 4.7. Domates mozaik virüsü (ToMV) allelleri için uygun PZR profilinde lokusların teyit edilmesi. Şekilde 1 nolu örnek DNA büyüklük markırı olup 2000, 1500, 1000, 750 ve 500 baz çifti boyundaki bantları görülmektedir. 2-5, 6-9, 10-13 ve 14-17 nolu kuyucuklarda bulunan örnekler sırasıyla Orient F₁, Pegasus F₁, Victory F₁ ve Bestona F₁ ait DNA örnekleri olup, sırasıyla TMV_FR1, TMV_FR2, TMV_FR3 ve TMV_FR4 primer çifti ile çoğaltılmıştır. Şekilde kullanılan PZR profili C olup PZR ürünleri %2 serva agaroz jelde 2.5 saat elektroforesis işlemi ile üretilmiştir.

Şekilde 4.7'de de görüleceği üzere 4 farklı amplifikasyon profilinden 3'ü farklı amplikon boyları üretmişlerdir. ToMV markırlarını multipleks PZR ile çoğaltma çalışmalarında TMV_FR1 ve TMV_FR2 ve ToMV_FR primer çiftlerinin aynı PZR profilinde çoğalabilmelerine rağmen çok yakın amplikon boyları üretmelerinden dolayı multipleks PZR'ye uygun olmadıkları tespit edilmiştir. Diğer taraftan TMV_FR1, TMV_F3 ve TMV_F4 primer çiftleri ile TMV_FR2, TMV_F3 ve TMV_F4 primer çiftleri ayrı ayrı iki set halinde multiplekse uygun olabileceği belirlenmiştir. Ancak multipleks PZR çalışmalarında birden fazla hastalık veya kalite özelliğinin test edilmesi aynı özelliğe ait farklı allellerin teşhisinden daha etkin ve ekonomik olacağı düşünülerek bu çalışmada salt ToMV kiti geliştirilmemiş buna karşın içerisinde ToMV'nin de bulunduğu farklı hastalık veya kalite özelliklerin testlerinin yapılabileceği diğer kitlerin geliştirilmesine ağırlık verilmiştir.

Kitlerin geliştirilmesinde çalışmada kullanılan lokuslara ait primer çiftlerinin optimal PZR profillerinin belirlenmesinden sonra aynı PZR ortamında (örneğin aynı PZR profilinde) çoğalma özelliği gösteren lokusların seçilmesinde allel veya lokus

boylarının karşılaştırılarak standart agaroz jel elektroforesis yöntemi ile ayrıştırılabilecek ve analiz edilebilecek lokusların belirlenmesine geçilmiştir (Şekil 4.8).

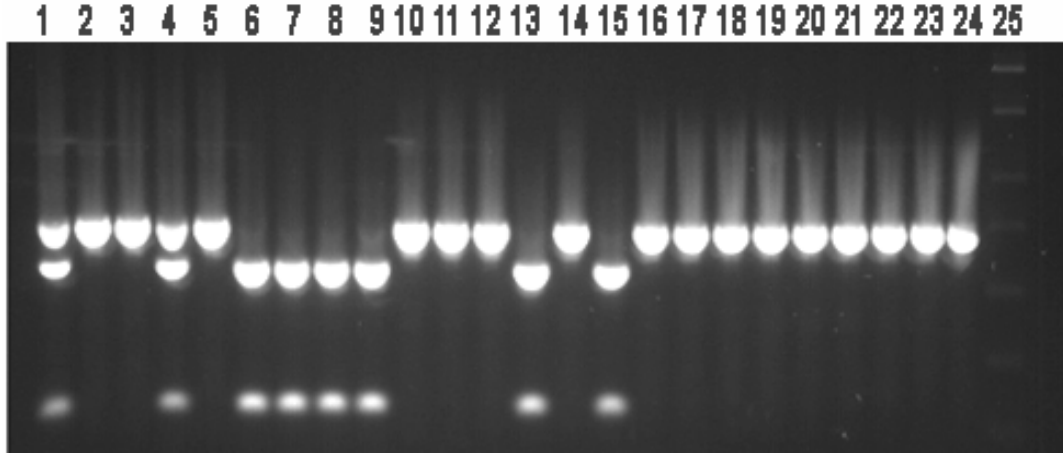
Şekil 4.8’de beta-karoten (*B* geni), asit fosfotaz (*Aps-1* geni), domates mozaik virüsü (*Tm²* geni), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*I-2* geni), *Pyrenochaeta lycopersici* (*py-1* geni), *Meloidogyne incognita* dayanıklılık (*Mi* geni) ve *Cladosporium fulvum* (*Cf* geni) çalışılarak multipleks olanakları araştırılmıştır. *B* genine ait bir primer çifti ile *Aps-1* geni, *Tm²* geninin iki alleli ile *I-2* geni ve *Mi* geni ile *Cf* geni aynı PZR profilinde çoğaltılabileceği saptanmıştır.



Şekil 4.8. BK_FR1, APS1_FR1, BK_FR2, CR_FR, ToMV_FR, Fus_FR2, REX_FR, C8B_FR, TMV_FR6, FLUV_FR, FUS_FR, FUS_FR1 allelleri için uygun PZR profilinde lokusların teyit edilmesi. Kuyucuk 1 ve 11 DNA büyüklük markırları olup 2000, 1500, 1000, 750 ve 500 baz çifti bantlarını göstermektedir. Kuyucuk 2: BK_FR1, 3: APS1_FR1, 4 BK_FR2, 5: CR_FR, 6: ToMV_FR, 7: FUS_FR2 8: REX_FR, 9: C8B_FR, 10: TMV_FR6, 12-15: FLUV_FR, 16-19: FUS_FR, 20-23: FUS_FR1.

Mi ve *Ty-1* genlerinin çalışmada kullanılan hibritlerde bulunması ve bu hibritlerin sadece heterozigot konumda olmaları nedeni ile değişik F_2 , hat ve çeşitleri kullanılarak bu örneklerin bu genlere ait genetik yapılarını ortaya koymak amacı ile çalışmalar yürütülmüştür. Şekil 4.9 *Mi* geni ve Şekil 4.10 ise *Ty-1* geni yönünden yapılan çalışmaları göstermektedir. Teşhis kitlerinin oluşturulmasında sadece heterozigot bireyler yönünden oluşturulan markırların kullanılmasının homozigot durumlarda ortaya çıkacak allellerin kit içerisinde kullanılan diğer allellerle aynı

boyu amplikon üretilmesi durumunda kitin güvenilirliği azalacağı düşüncesi ile mümkün olduğu kadarı ile bütün lokuslara ait homozigot dominant, homozigot resesif ve heterozigot durumları düşünülerek kitler oluşturulmaya çalışılmıştır.



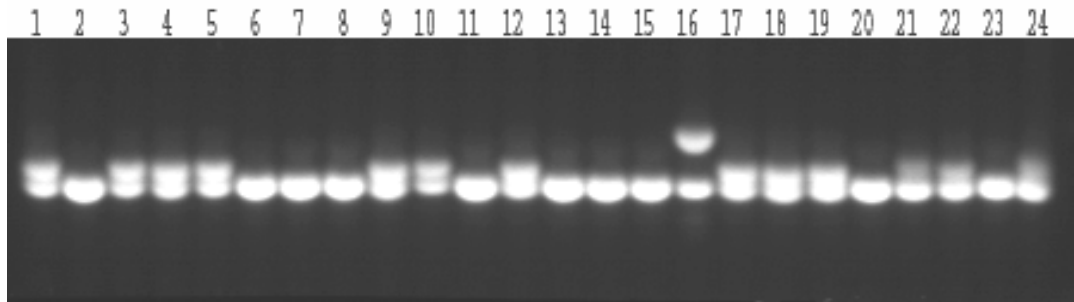
Şekil 4.9. *Meloidogyne incognita* dayanıklılık testi (REX_FR-*Taq* 1). Kuyucuklarda (1-24) bulunan örnekler domates ıslah hatları olup *MiMi*, *mimi* ve *Mimi* (homozigot dominant, homozigot resesif ve heterozigot) genotiplerini içermektedir. Kuyucuklar 1 ve 4’de bulunan örnekler *Mimi* genotiplere sahip olup heterozigottur. Kuyucuklar 6, 7, 8, 9, 13 ve 15’te bulunan örnekler *MiMi* genotiplere sahip olup homozigot dominanttır. Kuyucuklar 2, 3, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ve 24’de bulunan örnekler *mimi* genotiplere sahip olup homozigot resesiftirler.

Mi geni *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne arenaria* ve *Meloidogyne incognita* dayanıklılık mekanizmasına sahip olmasına rağmen yüksek sıcaklıklarda *Mi* geninin etkili olmadığı yönünde bulgular bulunmaktadır (Ammiraju vd 2003). Çalışmada yüksek sıcaklıklarda dahi etkili olan diğer bir dayanıklılık lokusuna özgü olan CB8_FR primer çifti de kullanılmıştır. CB8_FR primer çifti ile REX_FR bir arada bir kit içerisinde kullanımının büyük avantajları olacaktır. Ancak CB8_FR SCAR markırı iken REX-FR CAPS markırısıdır. Bu nedenle sadece REX_FR primer çifti ile çoğaltılan *Mi* geni CAPS kitlerden birine CB8_FR ise başka bir SCAR kitine eklenmiştir.

Kite eklemeyen önce REX-FR primer çifti 24 örnekte CAPS sistemi ile araştırılmış (Şekil 4.9) ve güvenilir sonuç verdiği görülmüştür. REX_FR primer çifti ile çoğaltılan amplikonlar dayanıklı ve hassas örnekler arasında bir farklılık ortaya koyamamaktadır ancak Şekil 4.9’da görüldüğü üzere *Taq* I restriksiyon enzimi ile

kesildiğinde 4 farklı allel üretmektedir. En büyük allel homozigot resesif ve heterozigot örneklerde, yukarıdan ikinci sıradaki allel homozigot dominant ve heterozigot örneklerde ve sondaki allel ise homozigot dominant ve heterozigot örneklerde bulunmaktadır. Bu yönü ile REX_FR primer çifti ve *Taq* I restriksiyon enzimi ile elde edilen *Mi* CAPS markırının ko-dominant karakterde olduğu teyit edilmiştir (Castro vd 2007). Bu çalışmada yapılan analizlerde *Mi* geni yönünden teşhis yapacak tanı kitinin CAPS sisteminde olması gerektiği ve SCAR tanı kitinde yer alamayacağı da görülmüştür.

Meloidogyne türleri tüm dünyada bitkisel üretimde önemli verim ve kalite kayıplarına sebep olmaktadır. Bu nedenle kök-ur nematoduna dayanıklı hatların teşhisi ve bu hatların domates ıslahında kullanılması oldukça önemlilik arz etmektedir. *Mi* dayanıklılık teşhisinde CAPS tekniğine uygun olması nedeni ile aynı tanı kiti içerisinde yer alabilecek ve *Meloidogyne* zararı kadar önemli bir zarara yol açan TYLCD hastalığına dayanıklılık teşhisinde kullanılabileceği ön görülmüştür. TYLCD dayanıklılık çalışmalarında CAPS markırı kullanılmakta olup *Mi* teşhisinde olduğu gibi *Taq* I restriksiyon enzimi kullanılmaktadır (Castro vd 2007). TYLCD tanısının güvenilirliğini test etmek amacı ile bu çalışmada TY1_FR primer çifti kullanılmıştır. TYLCD (*Ty-1* geni) değişik hat ve çeşitlere ait genomik DNA'lar kullanılarak uygun PZR profilinde çoğaltılmış ve *Taq* I restriksiyon enzimi ile kesim işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.10).

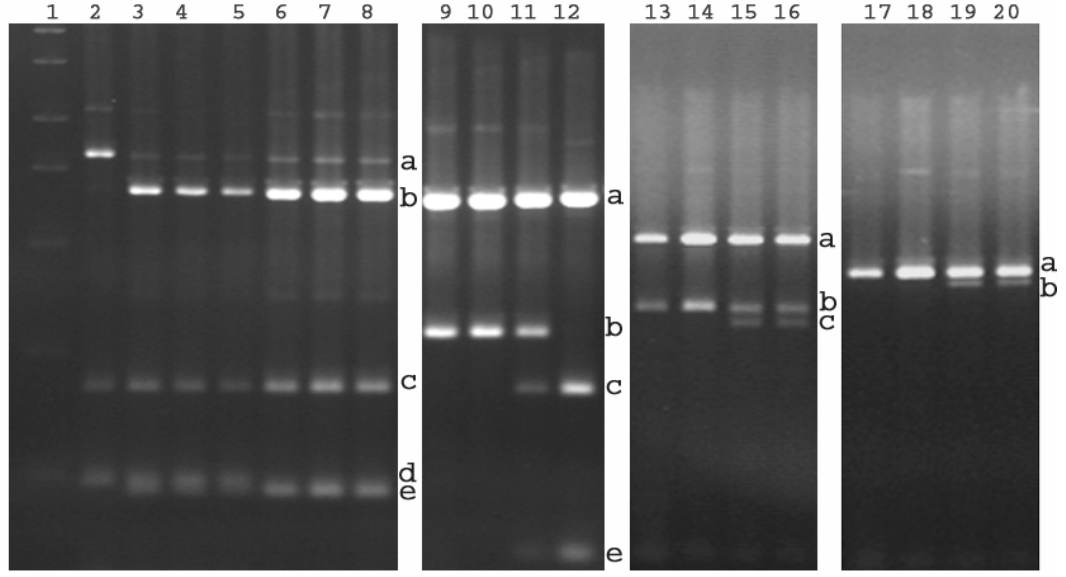


Şekil 4.10. TY1_FR primer çifti ile hat ve çeşitlerin taranması. Şekilde görüldüğü üzere 16 nolu örnek TYLCV hastalığına karşı dayanıklı, örneklerden 1, 3, 4, 5, 9, 10, 12, 17, 18, 19, 21, 22 ve 24 TYLCD yardımcı allellerini taşımakla birlikte hassas özelliكتedir. Şekilde geri kalan diğer örnekler ise tamamen bu hastalığa karşı duyarlı örneklerden oluşmaktadır.

TYLCD CAPS markırı *Mi* CAPS markırından farklı olarak dominant karakterdedir. Diğer bir söylemle homozigot dominant ve heterozigot genotipteki örnekler bir birlerinden ayırt edilememektedir. Şekil 4.10'da gösterilen 16 nolu örnek *Ty-I* genini taşımakta ancak *Ty-ITy-I* genotipi mi yoksa *Ty-Ity-I* genotipini mi taşıdığı dominant markır tipi nedeni ile bilinmemektedir. Ancak 2, 6, 7, 8, 11, 13, 14, 15, 20 ve 23 numaralı kuyucuklardaki örneklerin TYLCD'ye göre hassas oldukları düşünülmüştür. Diğer taraftan yardımcı alleller içeren 1, 3, 4, 5, 9, 10, 12, 17, 18, 19, 21, 22 ve 24 örneklerin TYLCD'ye dayanıklı olmamakla birlikte az da olsa tolerans gösterebilecekleri ön görülmüştür. Ayrıca bu tez çalışmasında kullanılan ve TYLCD'e dayanıklı olduğu bilinen hibrit çeşitlerde yapılan denemelerde hibritlerin biri hariç diğer hepsi Şekil 4.10'da gösterilen 16 numaralı örneğe benzer markır profili oluşturduğu ve dolayısı ile heterozigot oldukları görülmüştür.

REX_FR (*Mi* geni) ve CB8_FR (*Mil* geni) örneğinde görüldüğü üzere çalışmada belirlenen bazı tanı kitleri içerisinde aynı hastalığın teşhisinde kullanılabilecek farklı primer çiftleri bulunmaktadır. Örneğin REX_FR primer çifti CAPS tanı kitinde yer alırken CB8_FR primer çifti SCAR tanı kiti içerisinde de yer almıştır. Bu durumda her iki lokusun aynı multipleks PZR'ye alınmaması anlamına gelmektedir. Çalışmada orijinalde SCAR olarak belirlenen bazı markırların yüksek çözünürlük gerektirmeleri ve bazı durumlarda ise yayınlandığı makalelerdeki allellerin tekrar üretilmemeleri nedeni ile bu SCAR markırlarının CAPS markırlarına dönüştürme olanakları araştırılmıştır.

Aralarında beta karoten (*B* geni), *Verticillium dahliae* (*Ve* geni), asit fosfotaz (*Aps-1* geni), *Cladosporium fulvum* (*Cf* geni) ve *Oidium lycopersicum* (*Ol-1* geni) lokusları hibrit ve hatlarda da uygun PZR profillerinde çoğaltıldıktan sonra değişik restriksiyon enzimler kullanılarak eş-dominant CAPS markırlarına dönüştürülmesine yönelik çalışmalar yürütülmüştür. Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de oluşturulan CAPS markırları gösterilmektedir. Şekil 4.11'in incelenmesi ile görüleceği üzere SCAR markırı Beta (*B*) geni CAPS B markırına dönüştürülmüştür.



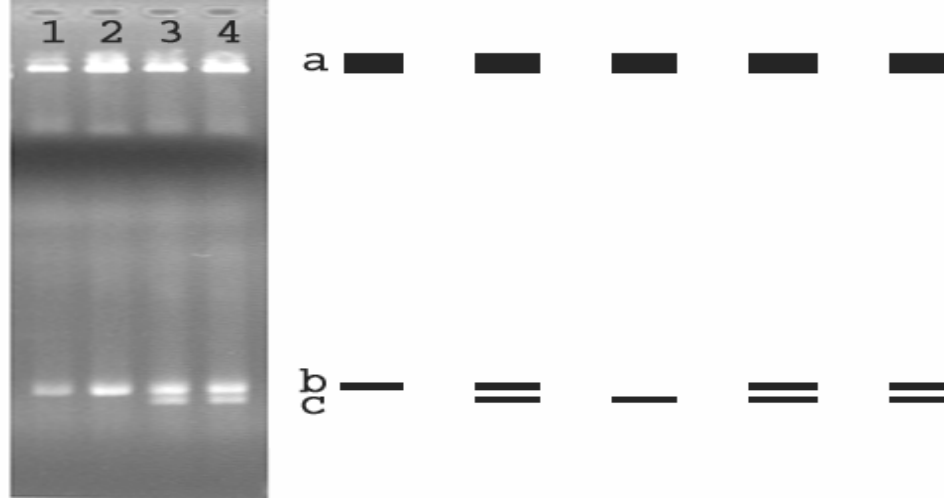
Şekil 4.11. *B*, *Aps-1* ve *Ve* lokuslarının restriksiyon enzimleri ile taranması. Şekildeki 1 nolu örnek DNA büyüklük markırı olup 2000, 1500, 1000, 750 ve 500 baz çifti bantlarını göstermektedir, kuyucuk numaraları 2 ile 8 arasındaki örnekler BK_FR1 primer çifti ile çoğaltıldıktan sonra *Rsa* I restriksiyon enzimi ile kesilerek CAPS markırına çevrilmiştir. Kuyucuk numarası 9 ile 12 arasındaki örnekler APS_RF primer çifti ile çoğaltıldıktan sonra *Taq* I restriksiyon enzimi ile kesilerek CAPS markırına çevrilmiştir. Kuyucuk numaraları 13-16 ve 17-20 arasındaki örnekler *Ve_FR* primer çifti ile çoğaltıldıktan sonra *Hinf* I (13-16) ve *Taq* I (17-20) restriksiyon enzimi ile kesilerek CAPS markırına çevrilmiştir.

Beta karoten lokusu yönünden testlemesinde (Şekil 4.11) c alleli *Rsa* I restriksiyon enzim ürünlerinin bilgi içeriğine sahip olmadığı ancak a, b, d ve e allelerin beta karoten lokusu yönünden genotip veya çeşitlerin analizinde kullanılabileceği belirlenmiştir. Analizde a, b, d ve e allelerinin hepsinin bulunması durumunda genotip veya çeşit heterozigot (*Bb*) genotipe sahip olduğu belirlenebilmektedir. Ancak çalışmada kullanılan hibrit, hat ve çeşitlerin beta karoten yönünden homozigot dominant (*BB*) ve homozigot resesif (*bb*) özellikleri bilinmediğinden geliştirilen kitin allelerinden yararlanılarak Şekil 4.11’de bulunan 2 nolu örneğin homozigot resesif karakterde olduğu, 3, 4, ve 5 nolu kuyucuklarda bulunan örneklerin heterozigot ve 6, 7 ve 8 nolu kuyucuklarda bulunan örneklerin ise dominant homozigot oldukları belirlenmiştir.

Şekil 4.11’de kuyucuk numarası 9 ile 12 arasındaki örnekler APS_RF primer çifti ile çoğaltıldıktan sonra *Taq* I restriksiyon enzimi ile kesilerek oluşturulan asit fosfataz (*Aps-1* geni) CAPS markırlarını göstermektedir. Bu analiz kitinde a ile gösterilen allel bütün örneklerde bulunmakta olum testleme yönünden önemsizdir. Allel adları b, c ve d olarak isimlendirilen markırların üçünü birden bulunduran örneklerin heterozigot *Aps-1aps-1* genotip olduğu, sadece c ve d allelerini içeren örnekler homozigot dominant (*Aps-1Aps-1*) ve sadece b allelini içeren örneklerin ise homozigot dominant (*aps-1aps-1*) özellikte olduğu belirlenebilmektedir. Şekil 4.11’de 12 numaralı kuyucukta bulunan örnek *Aps-1* geni açısından homozigot dominant, 9 ve 10 numaralı kuyucuklarda bulunan örnekler *Aps-1* geni açısından homozigot resesif genotipe sahip iken 11 numaralı örnek heterozigot genotipe sahiptir.

Çalışmada *Verticillium dahliae* (*Ve* geni) ampikonu *Hinf* I (Şekil 4.11’de 13-16 numaralı kuyucuklar) restriksiyon enzimi ile kesildiğinde *VeVe* ve *Veve* genotiplerinde 3 ürün *veve* genotiplerinde ise 2 ürün olduğu belirlenmiştir. Bu testlemede elde edilebilecek a alleli homozigot dominant, c alleli homozigot resesif ve b alleli ise heterozigot genotiplerde buldukları öngörülmüştür. *Verticillium dahliae* testelemesinde *Taq* I (Şekil 4.11 kuyucuklar 17-20) restriksiyon enzimininde kullanılabileceği belirlenmiştir. Ancak allelerin büyüklükleri birbirlerine oldukça yakın olmaları nedeni ile *Hinf* I restriksiyon enziminin kullanılmasının daha avantajlı olduğu belirlenmiştir.

Şekil 4.12’de gösterildiği üzere *Cladosporium fulvum* (*Cf* geni) lokusuna ait SCAR markırları CAPS markırlarına dönüştürülmüştür. Geliştirilen *Cf* CAPS markırı ile homozigot dominant ve heterozigot genotipe sahip bireyler homozigot resesif bireylerden ayırt edilebilmektedir. Şekil 4.12’de görüldüğü üzere a alleli testleme açısından bir önem göstermezken b alleli homozigot dominant (*CfCf*) ve heterozigot (*Cf cf*) genotiplerde bulunmaktadır. Diğer bir allel olan c alleli ise homozigot resesif (*cf cf*) genotiplerde bulunmaktadır. Çalışmada daha önceki çalışmalarla belirlenmiş olan ve dominant karektere sahip SCAR markırı ko-dominant CAPS markırına dönüştürülmüştür.



Şekil 4.12. *Cladosporium fulvum* (*Cf* geni) lokusuna ait SCAR markırının CAPS markırına dönüştürülmesi. Kuyucuklar 1-4 farklı domates hat ve çeşitlerine ait *Cladosporium fulvum* (*Cf* geni) lokuslarının *Rsa* I enzimi ile kesilmesi sonucu oluşturulan ürünler (alleler). Kuyucuklarda bulunan örnekler homozigot (1 ve 2 nolu kuyucuklar) ve heterozigot (3 ve 4 nolu kuyucuklar) genotipe sahip örneklerden oluşmaktadır. Allelerden a bütün örneklerde bulunmakta olup testleme açısından önemli değildir.

4.8. Multipleks Tanı Kitlerinin Geliştirilmesi

'Sequence Characterized Amplified Regiona' (SCAR) veya teknik olarak çok benzeyen STS ('Sequence Tag Sites') DNA markırları RAPD, AFLP, cDNA veya genomik DNA dizileri kullanılarak oluşturulabilmektedir. SCAR markırlarının elde edilmesinde genellikle 22-24 nükleotid uzunluğunda primer çiftleri kullanılmakta ve T_a 'sı yüksek PZR çalışmaları ile ampliconlar elde edilebilmektedir. SCAR tekniği genel olarak dominant tipde markır üretmektedir.

CAPS ('Cleaved Amplified Polymorphic Sequence') veya diğer bir adıyla PCR-RFLP ('Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism') tekniğinde ise homolog olan iki veya daha fazla allel arasındaki DNA dizi farklılığı restriksiyon enzimler kullanılarak polimorfizmi orta koyan ve giderek yaygın bir şekilde kullanılan bir DNA tekniğidir. CAPS yönteminde yaygın olarak 20-24 nükleotid uzunluğundaki primer çiftleri cDNA, RAPD, AFLP, RFLP veya SCAR markırlarına ait diziler kullanılarak oluşturulmaktadır. Bu teknik ile genellikle ko-dominant markır üretilmektedir (Karaca vd 2008, İnce vd 2010a). Bu tez çalışmasında domateste verim ve kalite kaybına neden olan bazı hastalık, zararlı ve 2

kalite kriterlerinin moleküler yöntemler kullanılarak kısa ve etkin bir şekilde tanıların gerçekleştirilebileceği CAPS ve SCAR markırları geliştirilmiştir (Çizelge 4.3). Geleneksel olarak kullanılan moleküler teknikler örneğin SSR, RFLP, AFLP, RAPD, CAPS veya SCAR genellikle tek bir lokusun özelliklerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Tanı analizlerinin kısa ve ekonomik bir şekilde yapılabilirliğini artırmak amacı ile bu tez kapsamında multipleks ve singlepleks tanı kitleri geliştirilmiştir (Çizelge 4.3).

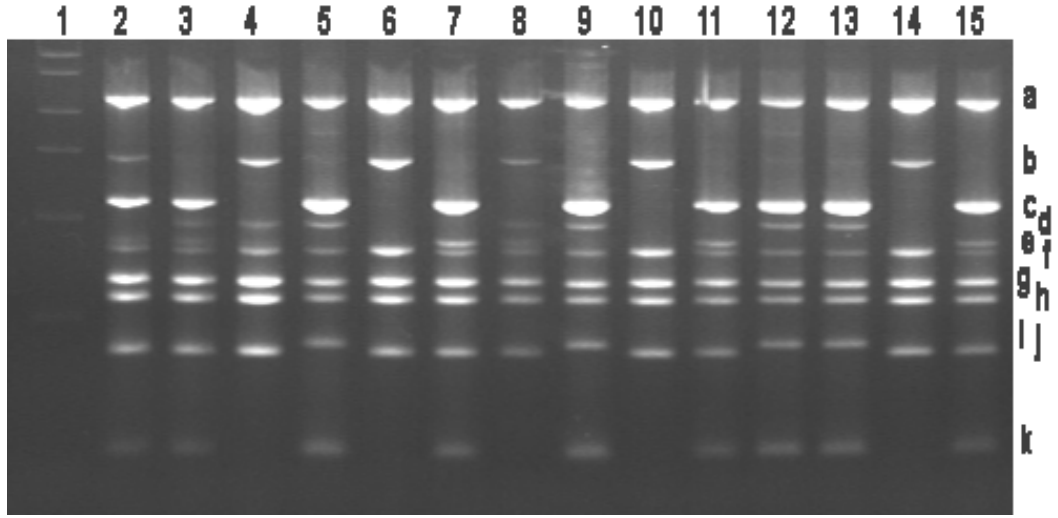
Çizelge 4.3. Çalışmada geliştirilen kitlerle tanısı yapılabilecek lokuslar

Gen	Etmen/Kaynak	Etki şekli
<i>Mi</i>	<i>M. incognita</i>	Kök-uru
<i>Ve</i>	<i>Verticillium dahliae</i> Kleb	Verticillium solgunluğu
<i>Ty-1</i>	TYLCV	Domates sarı yaprak kıvrıcıklığı virüs hastalığı
<i>py-1</i>	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	Mantari kök çürüklüğü
<i>Cf</i>	<i>Cladosporium fulvum</i>	Yaprak küfü
<i>Ol-1</i>	<i>Oidium lycopersicum</i>	Külleleme
<i>I2</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Fusarium solgunluğu
<i>Tm-2</i>	Tomato mosaic virus (ToMV)	Domates mozaik virüs hastalığı
<i>Sw-5</i>	Tomato spotted wilt virus (TSWV)	Domates lekeli solgunluk virüs hastalığı
<i>Aps-1</i>		Asit fosfotaz enzimi
<i>B</i>		Beta-karoten içeriği

4.8.1. Multipleks CAPS tanı kitlerinin oluşturulması

Çalışmada öncelikle dominant özellikteki SCAR markırları ile ampikon büyüklükleri aynı olan ve agaroz jelde ayırt edilemeyen SCAR markırları CAPS markır sistemine dönüştürülmeye çalışılmıştır. Çalışmada geliştirilmiş olan CAPS kitlerinden birisi *Pyrenochaeta lycopersici* (Schneider and Gerlach) fungusuna karşı resesif özellikteki dayanıklılık geni (*py-1*), 3 farklı *Meloidogyne* türüne karşı dominant özellik gösteren geni (*Mi*), domates sarı yaprak kıvrıcıklığı virüsü hastalığına (TYLCD) karşı eksik dominant özellikte olan gen (*Ty-1*) ile beta karoten geni olan ve dominant özellikteki *B* geni yönünden tanı yapabilen tek bir PZR ve tek bir restriksiyon enzimi ile sonuç alınabilen MK-N-TYLC-BK adı verilen bir kit geliştirilmiştir (Şekil 4.12).

Şekil 4.13’de gösterildiği üzere bu kit yardımı ile her hangi bir domates hat veya çeşidinin *py-1*, *Mi*, *Ty-1* ve *B* geni yönünden karakterizasyonu gerçekleştirilebilmektedir. Kit yöntem olarak *Mi* ve *Ty-1* yönünden Castro vd (2007) tarafından geliştirilmiş olan yöntemle benzetilmekte ancak *py-1* ve *B* geni teşhisi yönünden özgündür. *Ty-1* ve *Mi* geni domatesin 6. kromozomu üzerinde bulunmakta ancak aralarında doğrudan bir bağ bulunmamaktadır. Diğer taraftan *py-1* geni 3’cü kromozomda bulunurken *B* geni yine *Ty-1* ve *Mi* genlerinin olduğu gibi 6. kromozom üzerinde bulunmaktadır (Doğanlar vd 1998, Zhang vd Stommel 2001, Castro vd 2007).



Şekil 4.13. MK-N-TYLC-BK test kiti agaroz jel elektroforesis. Şekilde 1 nolu kuyucukta DNA büyüklük markırı ve kuyucuklar 2 ile 15 arasında hibrit, hat ve çeşitleri ait DNA’lar gösterilmekte olup PZR B profili ile çoğaltılmıştır. Bu kit 4 farklı lokusu aynı anda analiz edebilmekte ve MK: mantari kök çürüklüğü (CR_FR), N: kök-uru nematod (REX_FR), TYLCD: domates sarı yaprak kıvrıcıklığı virüsü (TY1_FR) ve BK: beta karoten (BK_FR) lokuslarını inceleyebilmekte ve bu lokuslar açısından örnekleri analiz edebilmektedir. Şeklin sağ yan tarafındaki harflerin her biri veya birden fazlası lokuslara ait alleller olup a alleli mantari kök çürüklüğü geni olan *py-1* genini (bütün örneklerde homozigot resesif), b alleli homozigot resesif veya heterozigot bireylerdeki *mi* genini, c alleli dominant *Mi* genini, d alleli *Ty-1* geni, e alleli *ty-1* genini, f alleli etkisiz (null) allel, g ve h allelleri B geni açısından heterozigotluğu, k alleli ise *Mi* genini göstermektedir.

Oidium lycopersicum özellikle örtüaltı domates yetiştiriciliğinde önemli bir zararlıdır. Huang vd (2000) *Oidium lycopersicum*’a karşı 5 farklı SCAR dayanıklılık

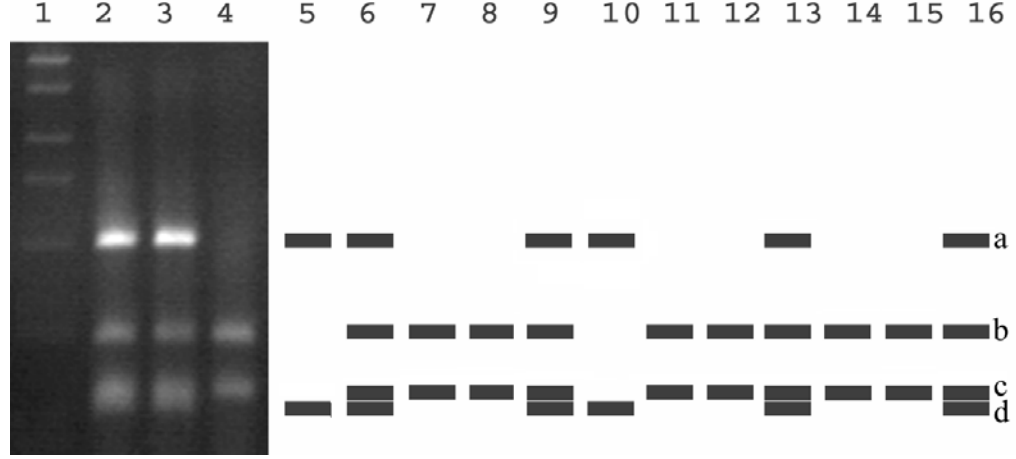
markırını RAPD tekniği kullanarak geliştirmişlerdir. Geliştirilmiş olan toplam 5 SCAR markırından iki tanesi *Ol-1* genine yakın DNA markırları olup dominant karakterdedir. *Ol-1* geni eksik dominant özellik gösteren bir gendir. Daha önce yapılmış çalışmalarda geliştirilmiş SCAR markırlarından (toplam 5 markır) iki tanesinin güvenilir olduğu bilinmektedir (Huang vd 2000). Ancak bu iki markırlara ait primer çiftlerinden biri dayanıklı hat veya çeşitlerde, diğerı ise hassas hat ve çeşitlerde ampikon üretmekte ve bazı durumlarda ise hassas çeşitlerde dayanıklılık markırını gözlemlenebilmektedir (Huang vd 2000). Çalışmada bu markırlar OL1_FR3 ve OL1_FR4 primer çiftleri ile temsil edilmektedir.

Çalışmada *Ol-1* dayanıklılık teşhisinde kullanılabilecek bir tanı kiti geliştirilmiştir. Geliştirilen *Oidium lycopersicum* teşhis kitinde, PZR profili B ile her iki primer çifti multipleks yapılarak çoğaltıldıktan sonra *Hinf* I restriksiyon enzimi ile kesilmiş ve %2'lik yüksek çözünürlüklü agaroz jel elektroforesis yöntemi ile ayrıştırıldığında Şekil 4.14'de gösterildiği üzere geliştirilen kit üzerinde çalışılacak olan hat veya çeşitleri *Oidium lycopersicum* etmenine karşı homozigot dominant, homozigot resesif veya heterozigot allelleri taşıdıklarını (ko-dominant özellik) saptayabilmektedir.

Huang vd (2000) tarafından geliştirilmiş olan SCAR markırlarının dominant özellikte olmaları nedeni ile *Oidium lycopersicum* hastalığına karşı dayanıklılık gösteren homozigot dominant bir genotipi heterozigot dominant genotipten ayırt edememekte iken bu çalışmada geliştirilmiş olan *Oidium lycopersicum* teşhis kiti genotipleri daha etkin bir şekilde allellik durumlarına göre belirleyebilmektedir. Diğer taraftan Huang vd (2000) geliştirmiş oldukları SCAR markırlarının sadece varlık ve yokluğu göstermeleri nedeni ile yokluk durumları PZR çalışmalarından da kaynaklanabileceği göz önüne alındığında çalışmada geliştirilen ko-dominant CAPS markırlarının güvenilirliği dikkat çekmektedir (Doğanlar vd 1998, İnce vd 2010a).

Ancak çalışmada belirlenmiş olan *Oidium lycopersicum* teşhis kiti CAPS markır tekniği olması nedeni ile PZR çalışmalarına ek olarak restriksiyon enzim uygulamaları gerektirmektedir. Bazı restriksiyon enzimleri çok pahalı olmasına rağmen *Oidium lycopersicum* teşhis kitinin kullandığı *Hinf* I enzimi en ucuz restriksiyon enzimleri arasında yer almaktadır.

Bu çalışmada geliştirilmiş olan *Oidium lycopersicum* teşhis kitinin domates ıslahında markır yardımı ile seleksiyon çalışmalarında etkin bir şekilde kullanılabilceği gibi çeşit karışımlarının belirlenmesinde de etkin olarak kullanılabilcek niteliktedir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. *Oidium lycopersicum* teşhis kiti. Kuyucuk 1 DNA büyüklük markırı olup yukarıdan aşağı 2000, 1500, 1000, 750, 500, 300 ve 150 baz çifti bantlar içermektedir. Kuyucuklar 2, 3, 6, 9, 13 ve 16 bulunan örnekler *OIIoII* heterozigot genotipleri, kuyucuklar 4, 7, 8, 11, 12, 14 ve 15 bulunan örnekler ise *OIIoII* homozigot dominant olduğu görülmektedir. 5 ve 10 nolu kuyucuklarda *oIIoII* içermektedir (homozigot resesif). Alleler a, b, c ve d heterozigot genotiplerde bulunurken, b ve c alleli homozigot dominant geneotiplerde bulunmaktadır.

4.8.2. Multipleks SCAR tanı kitlerinin oluşturulması

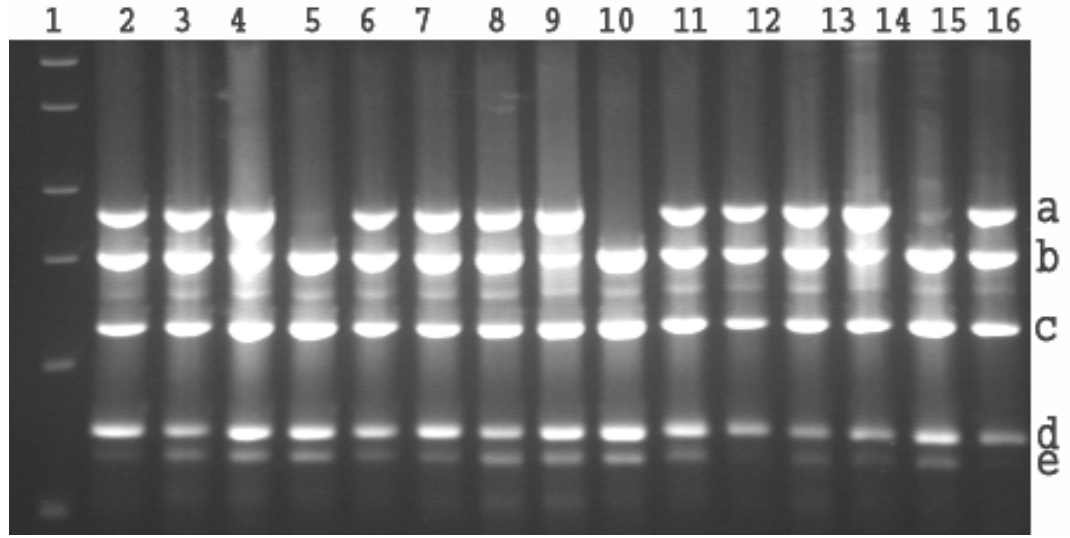
Çalışmada her biri 4 lokustan oluşan toplam 16 ve 3 lokustan oluşan toplam 3 olmak üzere toplam 19 SCAR kit kombinasyonu denenmiştir. Bu kombinasyonlar Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4’de gösterilen kombinasyonlar oluşturulurken kombinasyona alınan primer çiftlerinin amplicon boylarına ve amplifikasyon profiline dikkat edilmiştir. Oluşturulan kombinasyonlardan büyük çoğunluğu oluşturdukları multipleks ampliconları yönünden tekrar üretilebilirlik özelliği gösterememiştir. Bunun büyük bir ihtimalle primer dizilerinin birbirlerine benzemesi nedeninden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Çizelge 4.4. Çalışmada kullanılan SCAR lokus kombinasyonları

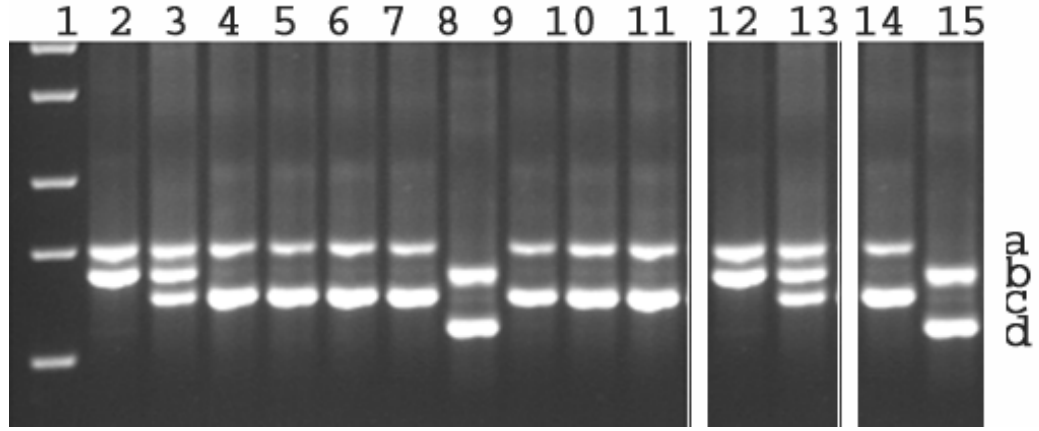
Kombinasyon 1	Kombinasyon 2	Kombinasyon 3	Kombinasyon 4	Kombinasyon 5
TSWV_FR	OL1_FR1	TSWV_FR	OL1_FR1	OL1_FR1
ToMV_FR	TSWV_FR	FUS_FR	C8B_FR	FUS_FR
FUS_FR	ToMV_FR	C8B_FR	TMV_FR2	C8B_FR
TMV_FR1	FUS_FR	TMV_FR2	Ve_FR	TMV_FR2
Kombinasyon 6	Kombinasyon 7	Kombinasyon 8	Kombinasyon 9	Kombinasyon10
OL1_FR4	OL1_FR4	OL1_FR4	ToMV_FR	OL1_FR3
TSWV_FR	TSWV_FR	FUS_FR	I2_FR	TSWV_FR
C8B_FR	C8B_FR	C8B_FR	TMV_FR1	FUS_FR1
Ve_FR	Ve_FR	TMV_FR1	Ve_FR	Ve_FR
Kombinasyon 11	Kombinasyon 12	Kombinasyon 13	Kombinasyon 14	Kombinasyon 15
FLUV_FR	OL1_FR4	FLUV_FR	ToMV_FR	ToMV_FR
ToMV_FR	FUS_FR1	OL1_FR5	TMV_FR1	FUS_FR1
FUS_FR1	TMV_FR1	ToMV_FR	TMV_FR3	TMV_FR1
TMV_FR1	Ve_FR	Ve_FR	Ve_FR	TMV_FR4
Kombinasyon 16	Kombinasyon 17	Kombinasyon 18	Kombinasyon 19	
OL1_F3R3	FUS_F1R1	TMV_F1R1	FLUV_FR	
TSWV_FR	I2_FR	TMV_F2R2	TSWV_FR	
FUS_F1R1	Ve_FR	TMV_F3R3	Ve_FR	
TMV_F1R1				

Tekrarlanabilir ve tekrar üretilebilir multipleks PZR çalışmaları için bu tezde çalışılan lokuslara ait yeniden primer çiftlerinin dizayn edilerek, yeniden değerlendirilmesi gerekmektedir. Kombinasyonlarda tekrarlanabilir ve tekrar üretilebilirlikleri tespit edilen külleme, fusarium, nematod ve domates mozaik virüsü hastalıklarına özgü primer çiftleri kullanılarak oluşturulan tanı kiti agaroz jel elektroforesis görüntüsü Şekil 4.15’da sunulmuştur.



Şekil 4.15. SCAR-OI-Fus-C8B-TMV test kiti agaroz jel elektroforesis. Şekilde 1 nolu kuyucukta DNA büyüklük markırı ve kuyucuklar 2 ile 16 arasında hibrit, hat ve çeşitlere ait DNA'lar gösterilmekte olup PZR B profili ile çoğaltılmıştır. Bu SCAR kiti ile 4 farklı lokusu aynı anda analiz edebilmekte ve OI: külleme (OI_FR1), Fus: fusarium (Fus_FR), C8B: yüksek sıcaklığa dayanıklı kök-uru nematodu (C8B_FR) ve TMV: domates mozaik virüsü (TMV_FR2) lokuslarını inceleyebilmekte ve bu lokuslar açısından örnekleri analiz edebilmektedir. Şeklin sağ yan tarafındaki harflerin her biri veya birden fazlası lokuslara ait allelleri nitelemekte olup a allelinin varlığı ToMV dayanıklılık, b allelinin varlığı küllmeye dayanıklılık, c allelinin varlığı fusariuma dayanıklılık ve d ve e allellerinin varlığı yüksek sıcaklıklarda dayanıklılık gösteren kök-uru nematoduna (*Mi*) dayanıklılığı göstermektedir.

Bu tez kapsamında çalışılan diğer hastalık, zararlı veya kalite karakterleri ile aynı anda analiz edilemeyen fusarium solgunluğuna karşı dayanıklılık testi için ayrı bir kit geliştirilmiştir ve Şekil 4.16'de ayrıca fusarium *I-2* genine dayanıklılık SCAR markırı gösterilmektedir. Bu test genotiplere bağlı olarak sayısı beşe varan allel oluşturabilmektedir. Allelerden biri 750 baz çifti uzunluğundan biraz büyük olup bazı genotiplerde bulunabilirken bazılarında bulunmamaktadır. Şekilde 4.16'te bu allel gösterilmemektedir. Tanı kitinde b ve c alleleri önemlidir. Sadece b allelini içeren genotipler (*I-2I-2*) genotipine sahip olup homozigot dominant genotiplerde bulunmaktadır. Diğer taraftan sadece c allelini içeren (*i-2i-2*) genotiplerde ve b ve c allelerini içeren örneklerin ise heterozigot (*I-2i-2*) genotipte olduklarını belirleyebilmektedir. Testlemede bulunabilecek a ve d alleleri ise fusarium solgunluğuna karşı dayanıklılık üzerine etkisi bulunmamaktadır.



Şekil 4.16. *I2* lokusunun taranması. Şekildeki 1 nolu kuyucuk DNA büyüklük markırını olup 2000, 1500, 1000, 750 ve 500 baz çifti bantlarını göstermektedir. Kuyucuk 2, 8, 12 ve 15 homozigot dominant, kuyucuk 3 ve 13 heterozigot ve kuyucuk 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11 ve 14 homozigot resesif genotipleri göstermektedir.

Bu tez kapsamında tekrarlanabilirlikleri ve tekrar üretilebilirlikleri yüksek olan SCAR ve CAPS markır sistemleri kullanılarak hastalık, zararlı ve kalite özelliklerinin belirlenmesinde kullanılabilecek daha hızlı ve ekonomik olan kitler geliştirilmiştir. Geliştirilen kitler kullanılarak domateste yaygın olarak görülen bazı hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık testlemelerinde kullanılabilecek nitelikte oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca bu tezde uygulanan yöntem ve yaklaşımlar kullanılarak başta *Solanaceae* familyası olmak üzere diğer kültür bitkilerinde de hastalık ve zararlılara dayanıklılık ve kalite özelliklerinin belirlenmesinde kullanılabileceği öngörülmüştür.

5. SONUÇ

Günümüzde domates yeryüzünde hemen hemen bütün ülkelerde yetiştirilmekte olan önemli sebzelerdendir. Ülkemizde domates üretimi 4.626.232 hektar alanda yapılmakta ve ortalama dekara verim 2.723 tonu bulmaktadır. Hollanda ile karşılaştırıldığında dekara verimimiz yaklaşık 12 kat daha az olduğu görülmektedir. Hollanda'nın bu başarısı kültürel işlemlerin yanı sıra hastalık ve zararlılara dayanıklı hat ve çeşitlerin kullanılması ve bu konuda yoğun çalışmaların yapılmasıdır.

Domateste 200'ün üzerinde hastalığın varlığı verim ve kaliteyi etkileyen en önemli faktörler arasındadır. Günümüzde bu hastalık ve zararlılara dayanıklılık genlerinin (lokusların) bir kısmı DNA markırları yardımıyla belirlenebilmektedir. DNA markırları veya işaretleyicileri, bitki ve hayvan cins veya çeşitleri arasındaki farklılığın tespit edilmesinde, çeşitlerle ebeveynleri arasındaki benzerliklerin belirlenmesinde, önemli hastalık ve zararlıların kromozom üzerindeki konumlarının belirlenmesinde (haritalama), cinsiyet tayininde, gıda maddelerinin içeriklerinde kullanılan tür ve cinslerin belirlenmesinde, genomda bulunan gen veya genlerin fiziksel olarak karakterize edilmesinde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır.

İdeal bir DNA markırının polimorfik olması (herhangi bir DNA dizi bölgesinde farklılığı tespit edebilmesi) ve genomda dağılım göstermesi (örneğin sadece genomun ökromatin veya heterokromatin bölgelerinde eşit sıklıkta bulunması), yeterli düzeyde çözünürlük vermesi (nükleotid düzeyde farklılığı ortaya çıkarabilmesi), güvenilir olması (aynı veya farklı laboratuvarlarda aynı sonucu verebilmesi), basit, hızlı ve ucuz olması, az miktarda DNA'ya ihtiyaç duyması, fenotipik ve lokus özelliklerine bağlılık göstermesi ve üzerinde çalışılacak olan organizmanın genom bilgisine ihtiyaç duymayan özellikte olması istenmektedir.

Hızlı ve düşük maliyetli tekniklerin kullanıldığı markır destekli yöntemlerin bitki ıslahında kullanılması önemlidir. Geleneksel olarak kullanılan moleküler teknikler örneğin SSR, RFLP, AFLP, RAPD, CAPS veya SCAR genellikle tek bir lokusa ait özelliklerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Günümüzde yeni teknikler geliştirilmekle birlikte bu tekniklerin hemen hemen hepsi dış kaynaklı olup yüksek maliyet gerektirmektedir. Maliyeti düşürmenin alternatif yöntemi ise var olan

tekniklerin etkin bir şekilde kullanılmasıdır. Domateste birden fazla hastalık veya zararlıya dayanıklılık markırının belirlenmesinde genellikle ayrı ayrı analizlere gerek duyulmakta ve bu durum yüksek maliyet ve zaman alıcı analizlerin yapılmasına neden olmaktadır. Bu tez çalışmasında domateste markır destekli seleksiyon çalışmalarında, çeşit ve hat ayırımında kullanılabilir birden fazla hastalığın veya kalite özelliğinin multipleks yöntemle belirlenmesi için geliştirilen tanı kitleri mevcut yöntemlerden daha kısa zamanda yapılabilmesi ve düşük maliyetli olması nedeniyle avantajlıdır.

Domateste daha önceden belirlenmiş ve literatürler de bulunan hastalık ve zararlılarla ilgili DNA markırlarının bir kısmı dominant karakterdedir. Dominant DNA markırları homozigot ve heterozigot lokus durumunu tam olarak ortaya koyamamaktadır. Bu durumda ko-dominant markırların etkinliğinin dominant özellikteki markırlara göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca bazı durumlarda dominant markırın varlığı veya yokluğu değerlendirmeye alındığı için markırın yokluğu olası Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) çalışmalarından kaynaklanabilecek hatalardan mı yoksa resesif özelliğinden dolayı mı sorularına net yanıt verememesi nedeniyle sonuçlarının kesin olarak belirlenebilmesinde sorunlar ortaya çıkmaktadır. Bu tür sorunlu markırların eş-dominant (ko-dominant) özelliğe dönüştürülmesi ile PZR çalışmalarının sonuçlarının daha etkin ve net olarak değerlendirilmeleri sağlanabilecektir.

Bu tez çalışmasında domateste verim ve kalite kaybına neden olan bazı hastalık, zararlı ve 2 kalite kriterinin moleküler yöntemler kullanılarak kısa ve etkin bir şekilde tanıların gerçekleştirilebileceği CAPS ve SCAR markırları geliştirilmiştir. Çalışmada geliştirilen multipleks ve singlepleks tanı kitleri, hastalık, zararlı ve kalite özelliklerinin belirlenmesinde, tanı analizlerinin kısa ve ekonomik bir şekilde yapılabilirliğini artırması yönünden ender bir çalışma niteliğindedir.

Bu tez kapsamında tekrarlanabilirlikleri ve tekrar üretilebilirlikleri yüksek olan SCAR ve CAPS markır sistemleri kullanılarak oluşturulan moleküler tanı kitleri kullanılarak *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Meloidogyne incognita* Kofoid and White, *Oidium lycopersicum*, domates mozaik virüsüne (ToMV), domates sarı

yaprak kıvrıkcık hastalığı (TYLCD), *Verticillium dahliae* Kleb., domates lekeli solgunluk virüsü hastalığına (TSWV), yaprak küfü, Patates Y virüsü (PVY), *Pyrenochaeta lycopersici* (Schneider and Gerlach) dayanıklı, Beta-karoten (*B*) içeriği yüksek, asit fosfotaz (*Aps-I*) lokuslarının kısa bir sürede belirlenmesinde kullanılabilir. Bu kitlerin kullanılmasıyla domates ıslahında dayanıklı ve seçkin çeşitlerin geliştirilmesine katkı sağlanabilecektir. Ulusal tohumculuk sektörümüzün bu kitleri kullanarak daha etkin ve güvenilir hatlar geliştirilmesine katkı sağlayabileceği ön görülmüştür.

6. KAYNAKLAR

- ANFOKA, H. G., ABHARY M. and STEVENS R. M. 2006. Occurrence of Tomato spotted wilt virus (TSWV) in Jordan. *Journal Compilation*, 36, 517–522.
- ANONYMOUS, 2007. <http://www.faostat.fao.org>.
- ANONİM, 2008. <http://www.tuik.gov.tr>.
- ANONİM, 2009a. <http://www.akib.org.tr>.
- ANONİM, 2009b. <http://www.kkgm.gov.tr>.
- ANONYMOUS, 2010. <http://www.fao.org>.
- ANONİM, 2010. Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü, Zirai Mücadele Teknik Talimatı, Ankara.
- BALINT-KURTI, P. J., DIXON, M. S., JONES, D. A., NORCOTT, K. A. and JONES, J. D. G. 1994. RFLP linkage analysis of the *Cf-4* and *Cf-9* genes for resistance to *cladosporium fulvum* in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 88 : 691–700.
- BAYRAKTAR, K., 1973. Sebze Yetiştirme Cilt I., Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 110.
- BECKMAN, C. H., 1987: The Nature of Wilt Diseases of Plants. APS Press, St Paul, MN, 1-175.
- BOITEUX, L. S., GIORDANO, L. B. 1993. Genetic basis of resistance against two *Tospovirus* species in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Euphytica* 71 : 151-154.
- BOYACI, H. F. 2007. Patlıcanlarda *Fusarium* Solgunluğuna Dayanıklılık Kaynakları ve Dayanıklılığın Kalıtımı, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 96 ss.
- BROWN, C.R., YANG, C.P., MOJTAHEDI, H., SANTO, G. and MASUELLI, R. 1996. RFLP Analysis of Resistance to Columbia Root-Knot Nematode Derived from *Solanum bulbocastanum* in a BC2 population. *Theoretical and Applied Genetics*, 92: 572-576.
- CASTRO, A.P., BLANCA, J. M., DIEZ M.J., VINALS F.N. 2007. Identification of a CAPS marker tightly linked to the Tomato yellow leaf curl disease resistance gene *Ty-1* in tomato. *European Journal of Plant Pathology*, 117 : 347-356.
- CHAGUE, V., MERCIER J. C., GUENARD, M., DE COUREEL, A., VEDEL, F. 1996. Identification and mapping on chromosome 9 of RAPD markers linked

to *Sw-5* in tomato by bulked segregant analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 92: 1045-1051.

- COBB, N.J. 2008. Studies On Transformation Of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and *Arabidopsis Thaliana* Using Chimerical Constructs Of Varying Tospoviral Origin. Brigham Young University, Master of Science, 94 pp.
- COMPANT, S., DUFFY, B., NOWAK, J., CLEMENT, C. and AIT BARKA, E., 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant 157 diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 : 4951-4959.
- DARBY, L.A., RITCHIE, D.B. and TAYLOR, I.B. 1978. Isogenic lines of the tomato *Ailsa Craig*. In Annual report of The Glasshouse Crops Research Institute, 1977. The Glasshouse Crops Research Institute, Rustington, Littlehampton, U.K. 168-184.
- DAVIES, J.N. and HOBSON, G.E. 1981. The constituents of tomato fruit - the influence of environment, nutrition and genotype. *CRC critical reviews in food Science and Nutrition*. 15 : 205-280.
- DAX, E., LIVNEH, O., ALISKEVICIUS, E., EDELBAUM, O., KEDAR, N., GAVISH, N., MILO, J., GEFFEN, F., BLUMENTHAL, A., RABINOWICH, H.D. & I. SELA. 1998. A SCAR marker linked to the ToMV resistance gene, *Tm2²*, in tomato. *Euphytica*, 101: 73-77.
- DAX, E., LIVNEH, O., EDELBAUM, O., KEDAR, N., GAVISH, N., KARCHI, H., MILO, J., SELA I. & H.D. RABINOWICH, 1994. A random amplified polymorphic DNA (RAPD) molecular marker for the *Tm2a* gene in tomato. *Euphytica*, 74: 159-163.
- DIEZ, M.J. and NUEZ, F. 2008. Tomato. Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera 14, 46022 Valencia, Spain Pages 249-323, Springer.
- DOĞANLAR, S., DODSON, J., GABOR, B., BECK-BUNN, T., CROSSMAN, C., TANKSLEY, S. D. 1998. Molecular mapping of the *py-1* gene for resistance to corky root rot (*Pyrenochaeta lycopersici*) in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 784-788.
- FAUQUET, C. M. & STANLEY, J. (2005). Revising the way we conceive and name viruses below the species level: a review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. *Archives of Virology*, 150: 2151-2179.
- FAZIO, G., MIKEL, R., STEVENS, M.R., JOHN, W., SCOTT, J.W. 1999. Identification of RAPD markers linked to fusarium crown and root rot resistance (*Frl*) in tomato. *Euphytica*, 105: 205-210.

- FINLAY, K. W. 1953. Inheritance of spotted wilt resistance in the tomato. II. Five genes controlling spotted wilt resistance in four tomato types. *Australian Journal of Biological Sciences*, 6 : 153-163
- FRARY, A., and S. D. TANKSLEY, 2001: The molecular map of tomato. In: R. L. Phillips, and I. K. Vasil (eds), DNA-based Markers in Plants, 2nd edn. Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants, Vol. 6, 405-420. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London.
- GARCIA, G.M., STALKER, H.T., SHROEDER, E. and KOCHERT, G. 1996. Identification of RAPD, SCAR and RFLP Markers Tightly Linked to Nematode Resistance Genes Introgressed from *Arachis cardenasii* into *Arachis hypogea*. *Genome*, 39: 836-845.
- GERLACH, W., SCHNEIDER, R. 1964. Nachweise in Pyrenochaeta-stadiums bei Stämmen des Korkwurzelreggers der Tomate. *Phytopathology*, Z 50 : 262-269.
- GENNARO, F., MIKEL R. S., SCOTT, J. W. 1999. Identification of RAPD markers linked to fusarium crown and root rot resistance (*Frl*) in tomato. *Euphytica* 105: 205-210.
- GOULD, W.A. 1983. Tomato Production, Processing and Quality Evaluation. Avi Publishing Company, Westport, CO., 445.
- GÜNAY, A. 1992. Özel Sebze Yetiştiriciliği Cilt 4. Çağ Matbaası, s.103, Ankara.
- HO, J. Y., WEIDE, R., MA, H. M., VAN WORDRAGEN, M. F., LAMBERT, K. N., KOORNEEF, M., ZABEL, P. & WILLIAMSON, V. M. 1992. The root-knot nematode resistance gene (*Mi*) in tomato: Construction of a molecular linkage map and identification of dominant cDNA markers in resistant genotypes. *The Plant Journal*, 2: 971– 982.
- HOGENBOOM, N.G. 1970. Inheritance of resistance to corky root in tomato. *Euphytica*, 19 : 413-425
- HUANG, C.C., CUI, Y.Y., WENG, C.R, ZABEL, P., LINDHOUT, P. 2000. Development of diagnostic PCR markers closely linked to the tomato powdery mildew resistance gene *Ol-1on* chromosome 6 of tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 101 : 918–924.
- HUANG, C.C. AND LINDHOUT, P. 1997: Screening for resistance in wild *Lycopersicon* species to *Fusarium oxysporum* race 1 and race 2. *Euphytica*, 93: 145-153.
- INCE, A. G. and KARACA, M. 2009. The MAGi RNA extraction method: highly efficient and simple procedure for fresh and dry plant tissues. *Journal of Science Food and Agriculture*, 89: 168-176.

- INCE, A. G., KARACA, M. & ONUS, A. N. 2010a. CAPS-microsatellites: use of CAPS method to convert non-polymorphic microsatellites into useful markers. *Molecular Breeding*, 25 : 491-499. doi:10.1007/s11032-009-9347-y.
- INCE, A. G., KARACA, M. and ONUS, A. N. 2010b. Polymorphic microsatellite markers transferable across *Capsicum* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 28 : 285-291.
- INCE, A.G. 2010. Doku/Organ Spesifik Mikrosatellit DNA Gen İçeriklerinin *Capsicum* cDNA Kütüphanelerinde *In Silico* ve *In Vitro* Yaklaşımlarla Belirlenmesi. Doktora tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 300ss.
- JOHNSON, A.V., FASSULIOTIS, G. 1984. Nematode Parasites of Vegetable Crops. W.R., Nickle. Plant and Insect Nematodes. Marcel Deccer Inc., New York and Basel, s. 323-372.
- KALOSHIAN, I., YAGHOUBI, J., LIHARSKA, T., HONTELEZ, J., HANSON, D., HOGAN, P., JESSE, T., WIJBRANDI, J., SIMONS, G., VOS, P., ZABEL, P., & WILLIAMSON, V. M. 1998. Genetic and physical localization of the root knot nematode resistance locus Mi. *Molecular and General Genetics*, 257 : 376–385.
- KARACA, M., INCE, A. G., ELMASULU, S. Y., ONUS, A. N. & TURGUT, K. 2005. Coisolation of genomic and organelle DNAs from 15 genera and 31 species of plants. *Analytical Biochemistry*, 343: 353-355.
- KARACA, M., INCE, A.G., TUGRUL, S., TURGUT, K., ONUS, A.N. 2008. PCR-RFLP and DAMD-PCR genotyping for *Salvia* species . *Journal of Science Food and Agriculture*, 88 : 2508-2516.
- KARAHAN, O. 1965. Muhtelif Sebzeerde Zararlı Hastalık Amilleri ve Mücadeleleri. Ayyıldız Matbaası, 52 s., Ankara.
- KAWCHUK, L.M, HACHEY J, LYNCH D.R. 1998. Development of sequence characterized DNA markers linked to a dominant verticillium wilt resistance gene in tomato. *Genome*, Vol. 41, 1998.
- KAWCHUK, L.M., LYNCH, D.R., HACHEY, J., AND BAINS, P.S. 1994. Identification of a codominant amplified polymorphic DNA marker linked to the verticillium resistance gene in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 89: 661.664.
- KAYGISIZ, H., AYBAK,H. Ç. 2004. Domates Yetiştiriciliği, Hasat Yayıncılık, İstanbul.
- LAPIDOT, M. & FRIEDMANN, M. 2000. Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminiviruses. *Annals of Applied Biology*, 140: 109–127.

- LANGELLA, R., ERCOLANO, M. R., MONTI, L. M., FRUSCIANTE, L., BARONE, A. 2004. Molecular marker assisted transfer of resistance to TSWV in tomato elite lines. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 79 : 806-810.
- LATERROT, H. 1992. Resistance genitors to tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). *Tomato Leaf Curl Newsletter*, 1 : 2-4.
- LIHARSKA, T., KOORNNEEF, M., VAN WORDRAGEN, M., VAN KAMMEN, A. & ZABEL, P. 1996. Tomato chromosome 6: Effect of alien chromosomal segments on recombinant frequencies. *Genome*, 39 : 485-491.
- LINCOLN, R.E. and PORTER J.W. 1950. Inheritance of beta-carotene in tomatoes. *Genetics*, 35: 206-211.
- MALHOTRA, S.K. and VASHISTHA, R.N. 1993. Genetics of resistance to Fusarium wilt race 1 in current tomato (*Lycopersicon pimpinellifolium*). *Indian Journal of Agricultural Science*, 63 : 246-347.
- MCGRATH, D. J., GILLESPIE, G. and VAWDREY, L. 1987: Inheritance of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races 2 and 3 in *Lycopersicon pennellii*. *Australian Journal of Agricultural Research*, 38: 729-733.
- MEDINA-FILHO, H. & TANKSLEY, S.D. 1983. Breeding for nematode resistance. In Evans, D. A., Sharp, W. R., Ammirato, P. V., & Yamada Y. (Eds.), *Handbook of plant cell culture* (vol I, pp. 904-923). New York: Macmillan.
- MESHI, T., MOTOYOSHI, F., MAEDA, T., YOSHIKAWA, S., WATANABE, H., OKADA, Y. 1989. Mutations in the tobacco mosaic virus 30-kDa protein gene overcome *Tm-2* resistance in tomato. *Plant Cell* 1: 515-522.
- MESSEGUER, R., GANAL, M., DE VICENTE, M.C., YOUNG, N.D., BOLKAN, H. & TANKSLEY, S.D. 1991. High resolution RFLP map around the root knot nematode- resistance gene (*Mi*) in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 82 : 529-536.
- MILLIGAN, S.B., BODEAU, J., YAGHOUBI, J., KALOSHIAN, I., and ZABEL, P. 1998. The Root-Knot Resistance Gene *Mi* from Tomato is a Member of the Leucine Zipper, Nucleotide Binding, Leucine-Rich Repeat Family of Plant Genes. *Plant Cell*, 10: 1307-1321.
- MIAO, L., SHOU, S., CAI, J., JIANG, F., ZHU, Z., LI, H. 2009. Identification of two AFLP markers linked to bacterial wilt resistance in tomato and conversion to SCAR markers. *Molecular Biology Reports* 36: 479-486.
- MILLER, P. 1768. *The Gardeners dictionary: containing the best and newest methods of cultivating and improving the kitchen, fruit, flower garden and nursery*

plants; 4th ed. Revised and altered according to the latest system of botany. London Vol 1.

- MOREIRA, L.A., MOLLEMA, C., HEUSDEN, V.S. 1999. Search for molecular markers linked to *Liriomyza trifolii* resistance in tomato. *Euphytica* 109: 149–156.
- MOTOYOSHI, F. & OSHIMA, N. 1977. Expression of genetically controlled resistance to tobacco mosaic virus infection in isolated tomato leaf protoplast. *Journal of General Virology*, 34: 499–506.
- NISHIGUCHI, M., MOTOYOSHI, F., 1987. Resistance mechanisms of tobacco mosaic virus strains in tomato and tobacco. In: Evered D, Harnett S (eds) Plant resistance to viruses. John Wiley & Sons, Chichester, pp 38 - 46.
- OHMORI, S.T., MURATA, M., MOTOYOSHI, F., 2000. Molecular characterization of the SCAR markers tightly linked to the *Tm-2* locus of the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 64–69.
- OHMORI, T., MURATA, M. & MOTOYOSHI, F. 1996. Molecular characterization of RAPD and SCAR markers linked to the *Tm1* locus in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 92: 151–156.
- OHMORI, T., MURATA, M., MOTOYOSHI, F. 1995. Identification of RAPD markers linked to the *Tm-2* locus in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 90: 307–311.
- ÖZARSLANDAN, A. 2009. Türkiye'nin Farklı Bölgelerinden Alınan Kök-Ur Nematodu Türlerinin (*Meloidogyne* Spp.) Tanısı Ve Bazı Kök-Ur Nematodu Populasyonlarının Virülentliğinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 94 ss.
- PAIVA, S.A.R. and RUSSELL, R.M. 1999. Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *Journal Of The American College Of Nutrition*, 18: 426–433.
- PICO', B., FERRIOL, M., DI'EZ, M. J. & NUEZ, F. 1999. Developing tomato breeding lines resistant to Tomato yellow leaf curl virus. *Plant Breeding*, 118: 537–542.
- PICO', B., DI'EZ, M. J. & NUEZ, F. 1996. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The tomato yellow leaf curl virus a review. *Scientia Horticulturae*, 67: 151–196.
- PILOWSKY, M. & COHEN, S. 2000. Screening additional wild tomatoes for resistance to the whitefly-borne Tomato yellow leaf curl virus. *Acta Physiologiae Plantarum*, 22: 351–353.

- ROSELLO, S., DIEZ, M. J., NUEZ, F. 1998. Genetics of Tomato spotted wilt virus resistance coming from *Lycopersicon peruvianum*. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 499-509.
- SCHAIBLE, L., CANNON, O.S. and WADDOUPS, V. 1951. inheritance of resistance to verticillium wilt in a tomato cross. *Phytopathology*, 41: 986-990.
- SHARMA, K., AGRAWAL, V., GUPTA, S., KUMAR, R., PRASAD, M. 2008. ISSR marker-assisted selection of male and female plants in a promising dioecious crop: jojoba (*Simmondsia chinensis*) *Plant Biotechnology Reports*, 2: 239-243.
- SIMKO, I., COSTANZO, S., HAYNES, K.G., CHRIST, B.J. AND JONES, R.W. 2004. Linkage disequilibrium mapping of a *Verticillium dahliae* resistance quantitative trait locus in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) through a candidate gene approach. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 217-224.
- SKUPINOVA, S., VEJL, P., SEDLAK, P., BARDOVÁ, M., SRBEK, L., K LAPSTE, P., ZOUHAR, M., TESAŘOVÁ, B. 2004. Using DNA markers for characterisation of tomato resistance against root nematode *Meloidogyne incognita*. *Plant, Soil and Environment*, 50: 59-64.
- SMITH, P.G. 1944. Embryo culture of a tomato species hybrid. *The American Society for Horticultural Science*, 44: 413-416.
- STALL, R.E. and WALTER, J. M. 1965. Selection and inheritance of resistance in tomato to isolates of races 1 and 2 of the *Fusarium* wilt organism. *Phytopathology*, 55: 1213-1215.
- STANIASZEK, M., KOZIK, E. U., MARCZEWSKI, W. 2007. A CAPS marker TAO1902 diagnostic for the *I-2* gene conferring resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 in tomato. *Plant Breeding*, 126: 331-333.
- STEWENS, M. R., HEINY, D. K., GRIFFITHS, P. D., SCOTT, J. W. and RHOADS, D. D. 1996. Identification of co-dominant RAPD markers tightly linked to the tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance gene *Sw-5*. *Tomato Genetics Cooperative Report* 46,27-28. Blackwell Publishing Ltd, Oxford.
- STEVENS, M.R., LAMB E. M. and RHOADS, D. D. 1995. Mapping of *Sw-5* locus for Tomato spotted wilt virus resistance in tomatoes using RAPD and RFLP analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 90: 451-456.
- STEVENS, M. R., SCOTT, S. J., GERGERICH, R. C. 1992. Inheritance of a gene for resistance to Tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica*, 59: 9-17.
- STEVENS, M. A. and RICK, C. M. 1986. Genetics and breeding. In: J. G. Atherton, and J. Rudich (eds), *The Tomato Crop*, 35-109. Chapman & Hall Ltd, London.

- SWAMINATHAN, M.S. 1993. From nature to crop production. In Proc. of the Int. Crop Science Congress. *Crop Science Society of America*, 385-394.
- TAKKEN, L. W. F., THOMAS, M. C., JOOSTEN, H. A. J. M., GOLSTEIN, C., WESTERINK, N., HILLE, J., NIJKAMP, J. H., DE WIT, J. G. M. P., JONES, D. G. 1999. A second gene at the tomato *Cf-4* locus confers resistance to *Cladosporium fulvum* through recognition of a novel avirulence determinant. *The Plant Journal*, 20: 279-288.
- TAMULONIS, J.P., LUZZI, B.M., HUSSEY, R.S., PARROTT, W.A. and BOERMA, H.R. 1997a. DNA Markers Associated with Resistance to Javanese Root-Knot Nematode in Soybean. *Crop Science*, 37: 783-788.
- TAMULONIS, J.P., LUZZI, B.M., HUSSEY, R.S., PARROTT, W.A. and BOERMA, H.R., 1997b. DNA Marker Analysis of Loci Conferring Resistance to Peanut Root-Knot Nematode in Soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 664-670.
- TANKSLEY, S.D., GANAL, M.W., PRINCE, J.P., DE VICENTE, M.C., BONIERBALE, M.W., BROUN, P., FULTON, T.M., GIOVANORI, J.J., GRANDILLO, S., MARTIN, G.B. MESSEGUER, R., MILLER, J.C., MILLER, L., PATERSON, A.H., PINEDA, O., RODER, M.S., WING, R.A., WU W. & YOUNG, N.D. 1992. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genome. *Genetics*, 132: 1141-1161.
- THOMAS, C. M., VOS, P., ZABEAU M., JONES, D. A., NOROTT, K. A., CHADWICK, B. P. and JONES, J. D. G. 1995. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. *The Plant Journal*, 8: 785-794.
- VAN DER BEEK J.G, PET, G., LINDHOUT, P. 1994. Resistance to powdery mildew (*Oidium lycopersicum*) in *Lycopersicon hirsutum* is controlled by an incompletely dominant gene *Ol-1* on chromosome 6. *Theoretical and Applied Genetics*, 89: 467-473.
- VAN ZIJL, J. J. B., BOSCH, S. E., COETZEE, C. P. J. 1986. Breeding tomatoes for processing in South Africa. *Acta Horticulturae*, 194: 69-75.
- WILKES, G. 1993. Germplasm collections: Their use, potential, social responsibility, and genetic vulnerability. in Proc. of the Int. Crop Sci. Cong. Ames, USA. *Crop Science Society of America*, 445-450.
- WILLIAMSON, V.M., COLWELL, G. 1991. Acid Phosphatase-1 from Nematode Resistant Tomato. *Plant Physiology*, 97: 139-146

- WILLIAMSON, V.M., HO, J.Y., WU, F. F., MILLER, N. & KALOSHIAN, I. 1994. A PCR-based marker tightly linked to the nematode resistance gene, *Mi*, in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 87: 757–763.
- YAGHOOBI, J., KALOSHIAN, I., WEN, Y. and WILLIAMSON, V.M. 1995. Mapping a new nematode resistance locus in *Lycopersicon peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 457-464.
- YOUNG, N.D., ZAMIR, D., GANAL, M.W. & TANKSLEY, S.D. 1988. Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNAMarkers tightly linked to the *Tm2a* gene in tomato. *Genetics*, 120: 579–585.
- ZAMIR, D., EKSTEIN-MICHELSON, I., ZAKAY, Y., NAVOT, N., ZEIDAN, M., SARFATTI, M., ESHED, Y., HAREL, E., PLEBEN, T., VAN-OSS, H., JEDAR, N., RABINOWITCH, H. D. & CZOSNEK, H. 1994. Mapping and introgression of a Tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, *Ty-1*. *Theoretical and Applied Genetics*, 88: 141–146.
- ZHANG, Y., STOMMEL, J.R. 2001. Development of SCAR and CAPS Markers Linked to the Beta Gene in Tomato. *Crop Science*, 41: 1602–1608.

ÖZGEÇMİŞ

Fitnet YILDIZ 1984 yılında Yozgat'ta doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kayseri'de tamamladı. 2003 yılında Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nde üniversite eğitimine başladı. 2007 yılında Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nden bölüm ikincisi olarak mezun oldu. 2008 yılında Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2007-2009 yılları arasında AgroStar Tohumculuk firmasında Ar-Ge sorumlusu olarak çalıştı. Halen Vilmorin Anadolu Tohumculuk firmasında çalışmaktadır.