

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI DOMATES ÇEŞİTLERİNDE DOMATES LEKELİ
SOLGUNLUK VİRÜSÜNE (*Tomato spotted wilt virus = TSWV*)
DAYANIKLILIK GENİNİN MARKÖR DESTEKLİ SELEKSİYON
YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ**

Gülderen KOCA

Danışman: Doç. Dr. Bayram ÇEVİK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
ISPARTA – 2012**

TEZ ONAYI

Gülderen KOCA tarafından hazırlanan “**Farklı Domates Çeşitlerinde Domates Lekeli Solgunluk Virüsüne (*Tomato spotted wilt virus, TSWV*) Dayanıklılık Geninin Markör Destekli Seleksiyon Yöntemiyle Belirlenmesi**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Süleyman Demirel Üniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Bayram ÇEVİK (İmza)
Süleyman Demirel Üniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri :
Doç. Dr. Nejla YARDIMCI (İmza)
Süleyman Demirel Üniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı

Yrd. Doç. Dr. Mehtap ŞAHİN ÇEVİK (İmza)
Süleyman Demirel Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Prof.Dr. Mehmet Cengiz KAYACAN
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
2.1. Domateste Hastalık Yapan Virüsler.....	5
2.2. Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (<i>Tomato Spotted Wilt Virus</i> , TSWV).....	5
2.2.1. Partikül morfolojisi ve genom yapısı.....	5
2.2.2. Virüsün konukçuları.....	6
2.2.3. Virüsün taşınma yolları.....	7
2.2.4. Virüsün belirtileri.....	8
2.2.5. Hastalığın bulunuşu ve yaygınlığı.....	9
2.2.6. Hastalıkla mücadele.....	10
2.3. Moleküler Markörler.....	12
2.3.1. Markör Destekli Seleksiyon.....	13
2.4. Domateste Sw-5 geniyle ilgili (MAS) çalışmaları	14
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	19
3.1. Bitki Materyali.....	19
3.2. Domates Bitkilerinin Yetiştirilmesi.....	22
3.3. DNA İzolasyonu.....	22
3.4. Primerler.....	24
3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	25
3.5.1. Ribozomal RNA genlerinin çoğaltılması.....	25
3.5.2. Sw-5 lokusuyla bağlantılı markörlerin çoğaltılması.....	26
3.5.2.1. CT220 markörünün çoğaltılması.....	26
3.5.2.2. Sw5-2 markörünün çoğaltılması.....	27

3.5.2.3. Sw-5a-e markörünün çoğaltılması.....	27
3.6. Agaroz Jel Elektroforezi.....	28
3.7. Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE).....	28
3.7.1. Poliakrilamid jelin hazırlanışı.....	29
3.7.2. Gümüş boyama (silver staining).....	29
4.ARAŞTIRMA BULGULARI.....	31
4.1. DNA İzolasyonu Sonuçları.....	31
4.2. PCR Analizleri.....	32
4.2.1. 18S Ribozomal RNA geninin PCR'la çoğaltılması.....	33
4.3. CT220 Markörünün Çoğaltılması.....	34
4.4. Sw-5-2 Markörünün Çoğaltılması.....	37
4.5. Sw5-a-e Primerleriyle Yapılan PCR Sonuçları.....	39
4.6. Sw-5 Lokusunda Bulunan Genlerin Belirlenmesi.....	41
4.7. Domates Çeşitlerinin Dayanıklılık Markörlerine Göre Skorlanması.....	45
5.TARTIŞMA ve SONUÇ.....	49
6. KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	53

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI DOMATES ÇEŞİTLERİNDE DOMATES LEKELİ SOLGUNLUK VİRÜSÜNE (*Tomato Spotted Wilt Virus* = TSWV) DAYANIKLILIK GENİNİN MARKÖR DESTEKLİ SELEKSİYON YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

Gülderen KOCA

Süleyman Demirel Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Bayram ÇEVİK

Domates lekeli solgunluk virüsü (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de domates yetiştirilen alanlarda yaygın olarak bulunmakta ve domates üretiminde sorun oluşturmaktadır. TSWV bitkide solgunluk, meyvede deformasyon, sürgün uçlarından geriye doğru ölüme neden olup ürün kalitesi ve verimini düşürerek domates üretiminde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Daha önce yapılan araştırmalarda yabancı bir domates türü olan *Solanum peruvianum*'da bulunan dominant Sw-5 geninin domatesteki TSWV'e karşı dayanıklılık sağladığı belirlenerek bu gen birçok ticari domates çeşidine melezleme yoluyla aktarılmıştır (Oğuz ve ark., 2010). Sw-5 geniyle bağlantılı moleküler markörler geliştirilerek klasik ıslah yöntemlerin en büyük dezavantajı olan uzun seleksiyon sürelerinin kısaltılması için markör destekli seleksiyon yöntemi dünyada başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Ancak markör yardımıyla seleksiyon (MAS) gerek TSWV'ye dayanıklı çeşitlerin belirlenmesi gerekse ıslah çalışmalarında dayanıklı

bireylerin belirlenmesi amacıyla ülkemizde pek yaygın olarak kullanılmamaktadır. Bu çalışmada ülkemizde faaliyet gösteren 8 farklı tohumculuk firmasından temin edilen 71 farklı domates çeşidinin Sw-5 TSWV dayanıklılık genini taşıyıp taşımadıkları belirlenmiştir. Bu amaçla elde edilen domates tohumları ekilerek farklı domates çeşitlerinin fideleri geliştirilmiştir. Yetiştirilen domates fidelerinden genomik DNA izolasyonu yapıldıktan sonra bu çeşitlerin TSWV'a dayanıklılık durumları daha önce geliştirilen ve Sw5 lokusuyla bağlantılı olduğu gösterilen Sw-5-2, CT220 markörleri ve bu çalışmada geliştirilen Sw-5a-e markörüne spesifik primerler kullanılarak PCR yöntemiyle belirlenmiştir. Sw-5-2 markörüne spesifik primerlerle yapılan PCR sonuçlarına göre 71 örnekten 15 tanesinin TSWV'ne dayanıklı olduklarını ve bunların 14 tanesinin sw-5 geni için heterozigot oldukları belirlenmiştir. Buna karşın CT220 markörüne spesifik primerler yapılan PCR sonucunda 25 tane domates çeşidinin Sw-5 lokusu içermediği ve TSWV'ne karşı dayanıksız olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada geliştirilen Sw5-a-e markörüne spesifik primerlerle yapılan PCR taraması sonucunda ise 65 örneğin TSWV'una dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar domateste MAS yöntemi kullanılarak Sw-5 geninin varlığının etkin bir şekilde belirleneceğini ve ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen domates çeşitlerinin çoğunun TSWV'ne dayanıklılık sağlayan sw-5 lokusunu taşıdıklarını yani virüse dayanıklı olduklarını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Domates, domates lekeli solgunluk virüsü, markör destekli seleksiyon, PCR

2012, 60 sayfa

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

DETECTION OF *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) RESISTANCE GENE IN DIFFERENT TOMATO CULTIVARS BY MARKER ASSISTED SELECTION METHOD

Gülderen KOCA

SüleymanDemirel University

Graduate School of Applied and Natural Sciences

Department of Plant Protection

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bayram ÇEVİK

Tomato spotted wilt virus (TSWV) is common in the tomato growing regions of Turkey as it is in the world, and it is considered as a main problem in tomato cultivation. TSWV decreases the quality and outturn of the crop, thereby leading to substantial economic loss by causing wilting in plants, deformation in fruits, dieback in shoot tips and reducing the economic value of tomato. As a result of previously research, it was found that wild tomato species *Solanum peruvianum* contains the *Sw-5* gene conferring resistance to TSWV, and the resistance was transferred to many commercial tomato cultivars through classical breeding. In order to shorten the long periods of selection which is the most considerable disadvantage of classical breeding methods, with the help of developments in molecular markers, marker assisted selection (MAS) was successfully implemented all over the world linked to the *Sw-5* gene. However, MAS has not been commonly used in Turkey to determine the cultivar resistant to TSWV or to determine resistant lines and hybrids in breeding

programs. In this study, the presence of Sw-5 TSWV resistance gene in 71 different tomato cultivars supplied from 8 separate seedling companies operating in our country is determined. The tomato seeds obtained for this purpose was planted and seedlings of different tomato cultivars were grown in controlled environmental growth chamber. After the isolation of the genomic DNA from the grown tomato seedlings, the presence of the sw-5 gene conferring the resistance to TSWV was determined by PCR method using primers specific to three markers linked to Sw-5 gene. While two of these markers Sw-5-2 and CT220 were developed previously and proved to be related to Sw5 locus and one additional marker, sw5 a-e, was developed in this study. In PCR results obtained with primers specific to Sw-5-2 marker, 15 samples out of 71 were determined to be resistant to TSWV, and 14 out of these samples were determined to be heterozygote for sw-5 gene. On the other hand, the PCR results obtained by the primers specific to CT220 marker revealed that 25 tomato species did not contain Sw-5 gene and shown to be sensitive to TSWV. As a result of the PCR scan through the use of primers specific Sw5-a-e marker, it was ascertained that 66 of the samples were resistant to TSWV. The results of the all three markers showed that that the presence of the Sw-5 gene can effectively be identified by the use of MAS and that most of the tomato species commonly grown in Turkey contained sw-5 locus conferring resistance to TSWV and they are considered resistant to the virus.

Key Words: Tomato, tomato spotted wilt virus, marker assisted selection, PCR

2012, 60 pages

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca zengin bakış açısıyla beni aydınlatan ve bu çalışmayı yürütmemde sonsuz sabrı ile bana yardımcı olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Bayram ÇEVİK'e, tecrübelerini benimle paylaşan Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehtap ŞAHİN-ÇEVİK hocama teşekkür ederim.

Tez jürime katılarak görüş ve tecrübeleri ile tezime destek olan Doç. Dr. Nejla YARDIMCI hocama sonsuz şükranlarımı sunarım.

Fikirleri ile beni destekleyen tüm bölüm hocalarıma, manevi desteği ile bana güç veren Zir. Yük. Müh. Tuğba BAKIR, Yrd. Doç. Dr. Nevin AKDURA, Jeofizik Müh. Araş. Gör. Ezgi ERBEK'e ve diğer arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca yanımda olan ve bana hep güvenen anneme, babama ve ablama teşekkür ederim.

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi (SDÜ BAP) tarafından desteklenen 2786-YL-11 nolu proje kapsamında yürütülmüştür.

Gülderen KOCA
ISPARTA, 2012

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV) partiküllerinin elektron mikroskopunda çekilmiş görüntüsü.....	6
Şekil 2.2. TSWV ‘nün domates bitkisinde tripslerle taşınması.....	7
Şekil 2.3. TSWV’nün domateste oluşturduğu belirtiler.....	8
Şekil 3.1. İklim odalarında viyollerde yetiştirilen domates çeşitlerine ait fideler.....	21
Şekil 3.2. CTAB nükleik asit izolasyonunun aşamaları.....	22
Şekil 3.3. Yapılan PCR çalışmalarının aşamaları.....	24
Şekil 4.1. Örneklerin genomik DNA izolasyonlarının jel görüntüsü.....	29
Şekil 4.2. 18Sr RNA genine spesifik primerlerle yapılan PCR jel görüntüsü.....	32
Şekil 4.3. CT220 markörüne spesifik primerlerle yapılan PCR jel görüntüsü.....	34
Şekil 4.4. Sw-5-2 markörüne spesifik primerlerle yapılan PCR jel görüntüsü.....	37
Şekil 4.5. Sw5-a-e markörüne spesifik primerlerle yapılan PCR jel görüntüsü.....	39
Şekil4.6.Sw5-a-e primerleriyle çoğaltılan PCR ürünlerinin jel elektroforezi ayrıştırması sonucu sw-5 lokusunda bulunan genleri gösteren jel görüntüsü.....	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan domates çeşitleri ve TSWV'ne dayanıklılık durumları.....	18
Çizelge 3.2. Yapılan çalışmada kullanılan primerlerin adı, baz dizisi ve alınan kaynak.....	23
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan ve sw-5 lokusunu taşıdığı belirlenen domates çeşitlerinin sw-5a, sw-5b, sw-5c, sw-5d, sw-5e genlerini bulundurma durumları.....	41
Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan tüm domates çeşitlerinin sw-5 dayanıklılık markörlerini bulundurma durumları.....	44

1.GİRİŞ

Dünyada ve ülkemizde en çok yetiştirilen ve tüketilen ürünlerden biri olan domates bitkisi ilginç bir tarihe sahiptir. İlk olarak sarı renkli bir domates yabani türü Bolivya ve Peru'da bulunduktan sonra Meksika'da yetiştirilip, Kristof Kolomb'un Amerika'yı keşfinden sonra gemilerle Avrupa'ya gönderilmiştir. İtalyanların sarı renginden dolayı onu altın elma olarak adlandırmasının ardından çok geçmeden domatesin kırmızı türleri ortaya çıkmıştır. Domates Amerika'da ilk defa Thomas Jefferson tarafından yetiştirilmesine rağmen 1900 yılına kadar domatesi pek çok insan zehirli olduğuna inanarak yemeyi reddetmiştir (Anonim, 2011a). Ancak domates meyvesinin tadı ve lezzetinin anlaşılmasından sonra 1990'lü yıllarda yetiştiriciliği ve tüketimi hızla artarak dünyada en çok yetiştirilen, ticareti yapılan ve tüketilen sebzelerinden biri konumuna gelmiştir.

Domatesin çok fazla tüketilmesinin nedeni içerdiği besinler ve vitaminlerden dolayı insan beslemesine katkısının çok olmasındandır. Domates meyvesinde A, B1, B6, C vitaminlerinin yanında yüksek oranda likopen bulunmaktadır. Likopenin değişik kanser türlerine karşı önleyici etkisinin bulunmasının yanında likopen bağışıklık sistemini güçlendirir, beyin hücrelerini yaşlanmaya karşı korur, kan basıncını düşürür ve kolesterolü kontrol etmeye yardımcı olmaktadır. Ayrıca domates içerdiği vitaminlerle saç ve cilt sağlığı açısından da önem arz etmektedir. Domates meyvesinde bulunan bu vitaminler ve önleyici mineraller genellikle domatesin kabuğunda daha yüksek oranda bulunmaktadır (Anonim, 2011b).

Dünya'da ve Türkiye'de üretilen en önemli sebze türü olan domates *Solanacea* familyası içerisinde yer almaktadır. 2008 yılı FAO verilerine göre tüm dünyada 5.227.883 ha alanda 129.649.883 ton domates üretilirken ülkemizdeki 300.000 ha üretim alanında yılda 10.985.400 ton domates üretilmektedir. Dünya'da domates üretim miktarı yakından incelendiğinde 33,6 milyon ton üretimle Çin 1. sırada yer alırken onu 11,5 milyon ton ile ABD, 9,9 milyon ton ile Türkiye, 8.5 milyon ton ile Hindistan ve 7,5 milyon ton ile Mısır izlemektedir. Üretim açısından bu miktar ile Çin ve ABD'den sonra 3. sırada yer alan Türkiye domates üretiminde dünyada söz

sahibi ülkelerden biri olup Avrupa'nın en büyük domates üreticisi konumundadır (Anonim, 2010).

Domates taze olarak tüketildiği gibi işlenerek endüstride; salça, püre, konserve (dilimlenmiş, tüm soyulmuş), ketçap, domates suyu vb. yapımında da kullanılmaktadır. Dünyada domatesin en çok işlenerek bu ürünlere dönüştürüldüğü başta ABD'de Kaliforniya Vadisi olmak üzere Akdeniz kıyıları ve Çin'in Xinjiang ve İç Mongolia eyaletleri olmak üzere üç büyük bölge vardır. Bu üç bölge dünya işlenmiş domates ürünleri üretiminin %85'ni gerçekleştirmektedir (Bayraktar ve Kaya, 2009).

Domates ekonomik açıdan önemli tarımsal ürünlerden biri olup en fazla ticarete konu olan sebzelerin başında gelmektedir. Domates salçası, püresi, sosu vb. domates ürünlerinin dünyada 2,7 milyar dolarlık ithalat, 2,1 milyar dolarlık ihracat payı ile yaklaşık 5 milyar dolarlık bir domates endüstrisi gelişmiştir. Dünyada 2007 yılında 5,6 milyon ton taze domates ihracatı yapılarak 6,5 milyar dolarlık gelir sağlanmıştır. Dünyada en çok ihracat yapan ülkeler Meksika, İspanya, Hollanda, Ürdün, Türkiye şeklinde sıralanmaktadır. Taze domates ihracatında Türkiye dünyada 5. sırada yer almasına rağmen ton başına ihracat değeri oldukça düşüktür.

Domates ülkemizin en önemli sebze ürünü olup ülkemizin toplam sebze üretiminin yaklaşık %38'ini domates oluşturmaktadır. Ülkenin hemen her bölgesinde domates üretilmekle birlikte, taze tüketime yönelik domates üretimi genellikle Akdeniz kıyısında örtü altı alanlarda yapılmaktadır. Ülkemizde üretilen domatesin %20'si işleme endüstrisine gönderilmekte geriye kalan kısmı taze olarak ihraç edilmekte veya iç pazarda tüketilmektedir. Türkiye domates üretiminin %17'sini Antalya'da gerçekleştirmekte olup İzmir, Çanakkale ve Mersin diğer önemli üretim bölgelerini oluşturmaktadır. Antalya bölgesinde daha çok sofralık domates üretimi yapılırken endüstriye yönelik üretim ise genellikle Marmara ve Ege Bölgelerinde Balıkesir, Bursa, Manisa ve Çanakkale illerinde yapılmaktadır (Anonim, 2009).

Domateste hastalığa yol açan çok sayıda fungal, bakteriyel ve viral hastalık etmenleri bulunmaktadır. Domates yetiştirilen alanlarda 200'den fazla hastalığın domates bitkisine zarar vererek ekonomik kayıplara neden olduğu tespit edilmiştir (Chupp ve Sherf, 1960; Dixon, 1981; Berlinger, 1986; Watterson, 1986; Ganoo ve Saumtally, 1998).

Domateste hastalığa yol açan birçok viral etmen bulunmakla birlikte ticari olarak örtü altında ve açıkta domates yetiştiriciliği yapılan alanların hemen hemen hepsinde görülen domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV) domatesin en önemli hastalıkları arasında yer almakta olup önemli miktarda ürün kayıplarına neden olmaktadır. Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV) *Bunyaviridae* familyası *Tospovirus* grubuna dahildir. TSWV ilk kez 1915 yılında teşhis edilmiş olup 900'den fazla bitki türünde hastalık oluşturmaktadır. Virüs tohumla taşınmazken mekanik olarak ve farklı trips türleri ile taşınmaktadır. TSWV dünyanın birçok domates üretim bölgesinde yayılmış olup onlarca yılda milyarlarca dolarlık ürün kaybına neden olarak günümüzde de ekonomik önemini devam ettirmektedir (Pappu et al., 2000).

Bu nedenle uzun yıllardır TSWV'ne karşı dayanıklılık kaynakları araştırılarak genetik dayanıklılık geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu kapsamda yapılan çalışmalar sonucunda TSWV'ne karşı dayanıklılık sağlayan Sw-5 geni 1992 yılında domatesin yabani bir çeşidi olan *Solanum peruvianum* bitkisinde belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda TSWV'ne karşı dayanıklılık sağlayan Sw-5 geninin tek bir dominant gen olduğu belirlenerek melezleme ıslahı yoluyla ticari domates çeşitlerine aktarılmış ve bunun sonucunda yeni taze tüketime uygun ticari bir çeşit olan 'Stevens' çeşidi geliştirilmiştir (Stevens et al., 1992). Daha sonra Sw-5 geni melezleme ıslahı yoluyla birçok ticari domates çeşidine aktararak dünyanın farklı üretim bölgelerinde TSWV'ne dayanıklı farklı özelliklerde domates çeşitleri geliştirilip yetiştirilmeye başlanmıştır. Bu ıslah çalışmalarını destekleyip hızlandırmak amacıyla Sw-5 geniyle bağlantılı moleküler markörler geliştirilmiştir.

Moleküler markörler, genomda bir gen ya da gen bölgesi ile ilişkili DNA parçası olarak tanımlanmaktadır. Klasik ıslah yöntemlerinin etkinliğini artırmak ve ıslah

sürelerini kısaltmak amacıyla ıslahçılar tarafından istenilen özellikte bireylerin daha kolay ve güvenilir bir şekilde seçilmesini sağlayan markör destekli seleksiyon yöntemi kullanılmaya başlanmıştır. Markör destekli seleksiyon iki ebeveynin melezlenmesinden oluşturulan bitki popülasyonları içerisinde istenilen özellikleri taşıyan bireylerin bu özellikleriyle ilişkili markörler yardımıyla seçilmesine olanak sağlanmaktadır. Bu şekilde ıslah çalışmalarında seleksiyon süresi kısaltılarak ıslah çalışmaları hızlandırılmakta ve daha kısa sürede çeşit ıslahı sağlanmaktadır. Ayrıca belirleyici özelliklerle ilişkili markörler yardımıyla istenilen özelliklerle ilgili genlerin klonlanması sağlanmaktadır (Knapp, 1994).

Son yıllarda TSWV'ne dayanıklılık sağlayan Sw-5 geniyle ilişkili birçok markör geliştirilmiştir. Geliştirilen bu markörler domates ve diğer bitkilerde TSWV'ne karşı dayanıklılık geliştirmek amacıyla MAS yoluyla ıslahta veya dünyanın farklı domates üretim bölgelerinde yetiştirilen çeşitlerin TSWV'ne dayanıklılık durumlarının belirlenmesi amacıyla başarılı bir şekilde kullanılmıştır ve hala kullanılmaktadır.

Ülkemiz önemli bir domates üreticisi olmasına ve çok sayıda domates çeşidi yetiştirmesine rağmen Türkiye'de yaygın olarak yetiştirilen yerli ve yabancı domates çeşitlerinin Sw-5 genini içerip içermedikleri ve TSWV'ne karşı dayanıklı olup olmadıkları çoğunlukla bilinmemektedir. Bu çalışmanın amacı ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen yazlık, kışlık domates çeşitlerinin TSWV'ne karşı dayanıklılık sağlayan Sw-5 genini içerip içermediklerini markör destekli seleksiyon yöntemiyle belirlemektir. Buna bağlı olarak farklı tohum firmalarından temin edilen 71 farklı domates çeşidinde, sw-5 geniyle bağlantılı 3 farklı markör kullanılarak TSWV'ne dayanıklılık sağlayan sw-5 geni içerip içermedikleri markör destekli seleksiyon yöntemiyle belirlenerek bu domates çeşitlerinin TSWV'ne dayanıklılık durumları tespit edilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Domateste Hastalık Yapan Virüsler

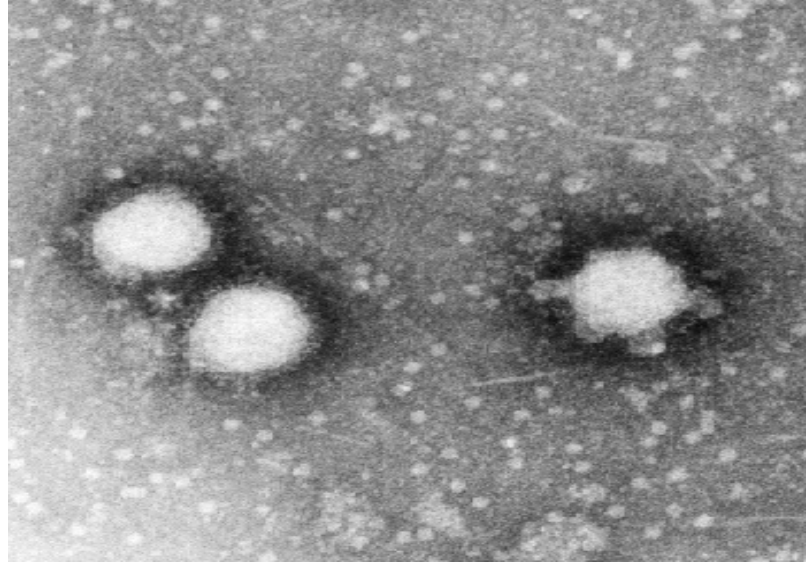
Dünyada domates ve biber yetiştiriciliği yapılan alanlarda, daha önce yapılan çalışmalarda çeşitli virüslerin varlığı tespit edilmiştir. Tütün mozayik virüsü (*Tobacco mosaic virus*, TMV), domates mozayik virüsü (*Tomato mosaic virus*, ToMV), hıyar mozayik virüsü (*Cucumber mosaic virus*, CMV), patates Y virüsü (*Potato virus Y*, PVY), tütün etch virüsü (*Tobacco etch virus*, TEV), yonca mozayik virüsü (*Alfalfa mosaic virus*, AMV) ve domates sarı yaprak kıvrıcıklık virüsünün (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) domates yetiştirilen alanlarda varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca domates lekeli solgunluk virüsü (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) hem domates hem de biber yetiştirilen alanlarda yaygın olarak bulunmakta ve önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Jones et al., 1993).

2.2. Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (*Tomato spotted wilt virüs*, TSWV)

Domates lekeli solgunluk virüsü (*Tomato spotted wilt tospovirus*, TSWV), *Bunyaviridae* familyasına bağlı *Tospovirus* grubuna dahil bir virüstür (Colariccio et al., 2004).

2.2.1. Partikül morfolojisi ve genom yapısı

TSWV 85 nm genişliğinde izometrik yapıda zarflı partiküllere sahiptir. Virionlar, %5 nükleik asit, %70 protein, %20 lipit ve %5 karbonhidrat içermektedir. Genom yapıları tek iplikçikli lineer yapıda 3 farklı RNA'dan meydana gelmektedir. En büyük genom parçası 8.897 kb (L-RNA), ikinci büyük parçası 5.4 kb (M-RNA) ve üçüncü büyük parçası 2.916 kb (S-RNA) uzunluğundadır. Nükleik asitleri, Haan (1990) tarafından izole edilerek temel bileşiminin oransal olarak %16.2 G, %31.6 A, %19.3 C ve %32.9 U'den oluştuğu belirlenmiştir (Küçük, 2006).



Şekil 2.1. Domates lekeli solgunluk virüsü partiküllerinin elektron mikroskopunda çekilmiş görüntüsü

(<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>)

2.2.2. Virüsün konukçuları

Domates lekeli solgunluk virüsü polifag bir virüstür. Domates, biber, marul, tütün, yerfıstığı ve farklı süs bitkileri bu virüsün konukçularındandır. TSWV; 15 monokotiledon ve 69 dikotiledon familya olmak üzere toplam olarak 84 familyada 900'den fazla bitki türünde hastalık oluşturabilmektedir. Ayrıca yabancı otlar ve süs bitkileri virüs kaynağı olarak bildirilmiştir (Gordillo et al.,2008).

Solanacea familyası virüsün ana konukçularını içermekte olup bu familyaya mensup 100'den fazla türde hastalığa yol açmaktadır. Bununla birlikte virüs toplam 271 kültür bitkisi türünde enfeksiyona neden olarak hastalık oluşturmaktadır. Virüsün hastalık yaptığı bitkiler arasında enginar, patlıcan, hindiba (*Cichorium* spp.), kabakgiller (hıyar, kavun ve karpuz), soya ve patates gibi önemli tarımsal ürünler de yer almaktadır. Her ne kadar virüsün nohut ve mercimekte de zarar oluşturduğu Brezilya'da bildirilmiş olsa da Akdeniz ülkelerinde bu bitkilerde virüsün varlığı henüz belirlenmemiştir. Süs bitkileri arasında ise başlıca konukçuları; *Aster*, begonya, *Dahlia* ve *Gerbera*'dır. Ayrıca *Amaranthus* spp., *Portulaca oleracea*,

Senecio vulgaris, *Solanum nigrum* gibi yabancı otlar da virüsün bilinen konukçuları arasında yer almaktadır. Bu ve diğer yabancı otlar da bu virüsün konukçularından olup virüsün epidemiyolojisinde de önemli rol oynamaktadırlar (Anonim, 2006).

2.2.3. Virüsün taşınma yolları

Virüs mekaniksel olarak ve trips vektörleriyle persistent olarak taşınmaktadır. TSWV, *Thysanoptera* takımı *Thripidae* familyası içinde yer alan 3 cinse (*Thrips*, *Frankliniella*, *Scirtothrips*) ait 9 trips türü ile sirkülatif ve propagatif olarak (vektörün hücrelerinde çoğalarak) taşınmaktadır. Bu türler arasında, soğan tripsi (*Thrips tabaci* Lindeman), batı çiçek tripsi (*Frankliniella occidentalis* Pergande), çiçek tripsi (*F. intonsa* Trybom), tütün tripsi (*F. fusca* Hinds), pamuk tripsi (*F. schultzei* Trybom), soya fasulyesi tripsi (*T. setosus* Moulton), kavun tripsi (*T. palmi* Karny), florida çiçek tripsi (*F. bisipinosa* Morgan) ve biber tripsi (*Scirtothrips dorsalis* Hood) bulunmaktadır (Kisha-Kumar et al., 1993; Johnson et al., 1995; Mound, 2001; Stumpf and Kennedy, 2005).



Şekil 2.2. TSWV 'nün domates bitkisinde tripslerle taşınması

<http://tr.wikipedia.org/wiki/Trips>

2.2.4. Hastalığın belirtileri

TSWV, domates bitkisinde; genç yaprakların bronz renge dönüşmesine, yapraklarda küçük ve fazla sayıda siyah lekeler oluşmasına, bitkide solgunluk ve cüceliğe, bitki gövdesinde siyah çizgi şeklinde lekelere, meyvelerin üzerinde klorotik halkalı lekelerin oluşmasına, meyvelerde deformasyon ve sürgün uçlarından itibaren geriye doğru ölümlerin oluşumuna neden olarak domates meyvelerinin kalite ve veriminde düşüş olmasına sebep olmaktadır. Bu şekilde deforme olmuş meyve, taze tüketimde kullanılamaz hale gelmekte, ekonomik değerini kaybetmekte ve pazarlanması zorlaşmakta hatta imkansız hale gelmektedir. Bu nedenle ülkemizde önemli bir sebze olan domates ve domateste zararı önemli bir virüs olan TSWV'ün belirlenmesi, şu an ve ileride karşılaşılabilecek sorunların da önlenmesi açısından büyük bir önem taşımaktadır (Korkmaz ve Turhan, 2006).



Şekil 2.3. TSWV'nün domateste oluşturduğu belirtiler

<http://www.settfest.com/2009/01/pests-and-diseases/>

2.2.5. Hastalığın bulunuşu ve yaygınlığı

Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV) ilk olarak, 1915 yılında Brittlebank tarafından Avusturalya'da domates bitkisi üzerinde tespit edilmiştir. Viral orijinli olduğu ise, Samuel et al., (1930) tarafından ortaya konulmuştur. Son yıllarda büyük ekonomik öneme sahip olan bu virüs dünyanın birçok domates üretim bölgesinde yaygın olarak görölmeye başlanmış, Kuzey ve Güney Amerika, Avrupa ve Asya kıtalarına kadar yayılmıştır (Adkins et al., 2005).

EPPO verilerine göre hastalığın dünyadaki coğrafik dağılımı aşağıdaki gibi bildirilmiştir. Virüs Cezayir, Avusturya, Belçika, Bulgaristan, Hırvatistan, Kıbrıs, Çek, Mısır, Fransa (ilk kez 1933'de görölmüş fakat 1987'den beri bir daha görölmemiş), Almanya, Yunanistan, Bulgaristan, İrlanda, İsrail, İtalya, Libya, Litvanya, Malta, Moldova, Hollanda, Polonya, Portekiz, Romanya, Rusya, Slovakya, İspanya, İsveç, Türkiye, Birleşik Krallık (İngiltere, İskoçya), Ukrayna ve Yugoslavya'da bulunmaktadır. Ayrıca Norveç, Danimarka ve Finlandiya'da virüs tespit edilmiş ancak eradike edilmiş veya edilmektedir. Tunus ve Fas'da ise virüsün varlığı rapor edilmesine rağmen henüz doğrulanmamıştır (Anonymous, 1998).

TSWV, ülkemizde ilk olarak Çanakkale, Balıkesir, Manisa, Uşak ve Samsun illerinde tütün bitkisinde, daha sonra; İzmir ve Manisa illerinde ise domates bitkisinde (Azeri, 1981; 1994), Akdeniz bölgesinde ise TSWV ilk olarak 1995 yılında Adana ilinde tespit edilmiş (Değirmenci ve Uzunoğullar, 2007) ve aynı dönemde Mersin ilinde yapılan bir çalışmada ise %86.5 oranında TSWV enfeksiyonu tespit edilmiştir (Güldür et al., 1995).

Çanakkale ilinde yapılan bir çalışmada 99,2 ha alandan 200 örnek alınarak ELISA ve DTBIA yöntemleriyle test edilmiştir. ELISA testi sonucunda 9 örnek TSWV ile enfekteli bulunmuştur. ELISA testinde TSWV ile enfekteli bulunan örnekler DTBIA yönteminde de enfekteli olarak bulunmuştur (Korkmaz ve Turhan, 2006).

Samsun ilinde yapılan bir çalışmada domates, biber ve tütün yetiştirilen alanlardan toplanan 414 adet yaprak örneği TSWV poliklonal antiserumu kullanılarak ELISA

yöntemiyle test edilmiştir ve 28 tanesi TSWV'le enfekteli bulunmuştur. Sonuca göre biber, tütün ve domates örneklerinden en yüksek absorbans değerine sahip birer TSWV izolatu seçilip test bitkilerine mekanik inokulasyon yapılmıştır. Seçilen tütün ve domates izolatlarının sw-5 genini içeren bazı domates çeşitlerinde dayanıklılığın kırılmasına sebep olduğu ancak biber izolatının dayanıklılığını kıramadığı saptanmıştır (Yıldırım ve Arlı Sökmen, 2011).

Batı Akdeniz bölgesinde yapılan bir çalışmada domates, biber, patates, marul, kabak ve hıyar yaprak örnekleri alınarak 12 bölgeden 337 örnek kullanılmış ve DAS-ELISA yöntemiyle testlenmiştir. Sonuçta 157 örnek TSWV ile enfekteli bulunmuştur (Yardımcı ve Kılıç, 2009).

Ülkemizin en önemli domates üretim bölgesi olan Antalya ve bazı ilçelerinde yapılan bir çalışma sonucunda, testlenen domates örneklerinden %80, biber örneklerinden %91 ve marul örneklerinden %93 oranında TSWV ile enfekteli bitki bulunmuştur (Bozdoğan, 2009). Marmara Bölgesi'nde (Bilecik, Bursa ve Sakarya) yapılan çalışma sonucunda testlenen bitki örneklerinin %5-78 oranında TSWV ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir (Değirmenci ve Uzunoğulları, 2007). Bu ve diğer çalışmalar TSWV' nün ülkemizin önemli domates üretim bölgelerinin tümünde yaygın olarak bulunduğunu göstermiştir.

2.2.6. Hastalıkla mücadele

Diğer virüslerle olduğu gibi domates lekeli solgunluk virüsüyle kimyasal mücadele mümkün değildir. Ancak kültürel önlemler alınarak virüsün yayılımı yavaşlatılarak hastalık yoğunluğu düşürülebilir. Bu amaçla sanitasyon uygulamalarına dikkat edilmeli ve fidelikler, özellikle süs bitkileri ve yabancı otların bulunmadığı bir alanda kurulmalıdır. Hastalıklı bir bitki belirlendiğinde, hemen sökülerek uzaklaştırılmalıdır. Duyarlı konukçular arasında yer alan süs bitkileri, bu tip seraların yakınında yetiştirilmemelidir. Seraların gerek iç gerekse dış alanlarında yabancı otların yok edilmesi hem enfeksiyon kaynağı olarak hem de trips popülasyonunu artırmaması açısından oldukça önemlidir. Seralar, dikim sonrasında mümkün olduğunca sık kontrol edilmeli ve sera içerisindeki sarı yapışkan tuzaklar ile trips

varlığı her an incelenmelidir. Seralarda tripslerin giremeyeceği delik çapına (0.2-0.3 mm) sahip tüller, ya da tel kullanımı da korunma amacıyla alınacak önlemler arasındadır. Domates yetiştiriciliğinde ışığı yansıtan malçların kullanımı, tamamen yok etmese de trips popülasyonunu düşürmede kullanılabilir. Özellikle trips türleri arasında TSWV'nü en hızlı ve aktif taşıyabilen *Frankliniella occidentalis*'in varlığı her zaman kontrol edilmelidir (Anonim, 2007). Ayrıca gerekirse trips türleriyle kimyasal mücadele yapılarak vektör popülasyonu düşürülmelidir. Bu hastalık etmeni virüs ile mücadele amacıyla birçok farklı yöntem denenmiş ancak en etkin yöntemin genetik dayanıklılık olduğu tespit edilmiştir (Stevens et al.,1992).

TSWV'ne dayanıklılık geliştirmek amacıyla doğal dayanıklılık genlerinin belirlenmesi için çok sayıda çalışma yapılmıştır.

Tsw geni biberde domates lekeli solgunluk tospovirus virüsüne karşı dayanıklılık sağlayan Sw-5 homologu gendir. Bu gen bir RAPD markörüyle bağlantılı olarak kromozom 10'un bir bölgesinde haritalanmıştır. Sw-5 'in birtakım homologları biber ve domateste karşılık gelen aynı pozisyonda bulunduğu halde Sw-5'in haritalanmamış homologları domateste fenotipik olarak benzer, baskın TSWV dayanıklılık geni *C. annuum*'da da aynı bölgede haritalanmıştır. Tsw ve sw-5 arasındaki ilişki TSWV'nün genetik çalışmaları boyunca incelenmiştir. Tswv-A'nın hacmi biberdeki Tsw ve domatesteki sw-5 geninin üstesinden gelmek için Tswv genomunun farklı bölgelerinde haritalanmıştır. Bu yüzden, biber ve domatesteki direncin fenotipik ve genetik benzerliklerine rağmen biz bundan şu anlamı çıkarırız; sw-5 ve Tsw taşıyan bitkilerde enfeksiyonun sonucunu ayrı viral gen ürünleri kontrol etmektedir (Jahn et al., 2000).

Amerika ve Brezilya işbirliği ile yapılan bir çalışmada geniş spektrumlu tospovirüs dayanıklılık geni olan sw-5 izolasyonu yapılarak elde edilen gen dizilimlerinin karşılaştırılması ile kök ur nematodu dayanıklılık geni olan Mi geninin homolog olduğu ve yapısal ve fonksiyonel olarak benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Brommonschenkel et al., 2000).

2.3. Moleküler Markörler

Markör herhangi bir birey veya popülasyonun bir karakteriyle veya bu karakterle bağlantılı fenotipik bir özellik bir gen ya da gen DNA parçası veya biyokimyasal madde olarak tanımlanmaktadır. Üç temel genetik markör tipi vardır: bunlardan birincisi morfolojik markörlerdir (klasik ya da görülebilir markörler) ki bunlar fenotipik özellikler ya da karakterlerdir. İkincisi biyokimyasal markörlerdir, bunlar enzimlerin allelik değişkenleridir ve izoenzimler olarak adlandırılırlar. Üçüncü markör sistemi moleküler ya da DNA markörleridir. Moleküler markörler DNA üzerindeki varyasyonları gösterir (Jones et al, 1997).

Morfolojik markörler genellikle çiçek rengi, tohum biçimi gibi görülebilir fenotipik karakterlerdir. İzoenzim markörleri, elektroforez işlemiyle ve spesifik boyamayla belirlenmektedir. İzoenzim ve morfolojik markörlerin sayılarının az olması, çevre faktörlerinden ve bitki gelişim evrelerinden etkilenmeleri bunların en önemli dezavantajlarıdır (Collard et al., 2005).

Moleküler markörler, genomda bir gen ya da gen bölgesine ilişkin DNA parçası olarak tanımlanmaktadır. Moleküler markörler bitkilerde başlıca, gen kaynaklarındaki bireylerin tanımlanması, akrabalık ilişkilerin belirlenmesi, haritalama ve seleksiyon amacıyla kullanılmaktadır. Bu tekniklerde başlangıçta enzim alt birimleri kullanılmakla birlikte daha sonra genomik DNA, organel DNA'sı ya da satelit bölgeler gibi kısımların esas alındığı DNA markörleri uygulama alanı bulmuştur (Ağaoğlu ve Ergül, 1999).

DNA markörleri, genel olarak sayılarının çok olmasından dolayı en yaygın kullanılan markör tipidir. Bu markörler, DNA'da oluşan nokta mutasyonları, insersiyonlar, delesyonlar veya DNA'nın replikasyonunda oluşan hatalardan meydana gelmektedirler (Paterson,1996; Collard et al., 2005). Morfolojik ve biyokimyasal markörlerin tersine, DNA markörleri sınırlı sayıda değildirler, çevresel ve bitki gelişim evrelerinden etkilenmezler (Collard et al., 2005).

DNA markörleri kullanılan yöntemler temelinde 3 ana gruba ayrılabilir: (1) hibridizasyona dayalı markörler; RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ve oligonükleotid parmak izlerinin çıkarılması, (2) polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayalı markörler; RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), SSR (Simple Sequence Repeat), STS (Sequence-Tagged Site), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat), CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), ALP (Amplicon Length Polymorphism) markörleri, (3) DNA sekanslamasına dayalı yöntemler; SNP (Single Nucleotide Polymorphism) markörleri örnek olarak verilebilir (Jones et al., 1997; Gupta et al., 1999).

Yukarıda belirtilen 3 grup markörler dışında MP-PCR (Microsatellite Primed Polymerase Chain Reaction), AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction), AS-PCR (Allele Specific Polymerase Chain Reaction), DAF (DNA Amplification Fingerprinting) stratejileri de polimorfizmin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Gupta et al., 1999). Bu markörlerin hızlı sonuç vermeleri, çevre şartlarından etkilenmemeleri ve seleksiyon aşamasındaki doğrulukları, agronomik açıdan üstün karakterlerin seçiminde, markörler yardımıyla seleksiyonu en güvenilir uygulama haline getirmiştir (Budak ve ark., 2004).

Tospovirus dayanıklılığıyla ilişkili markörler geliştirmek amacıyla çalışmalar yapılmıştır ve bu amaçla markör destekli seleksiyon çalışmalarında kullanılmak üzere moleküler markörler geliştirilmiştir.

2.3.1. Markör destekli seleksiyon (MAS)

Uzun ve zahmetli fenotipik seleksiyon aşamasından dolayı klasik melezleme ıslahı zaman alıcı ve çevre şartlarına çok bağlı bir yöntemdir. Sebzeçilikte yeni bir çeşidin ıslahı sekiz ile on iki yıl arasında bir süre almakta ve hatta bu geliştirilen çeşidin piyasaya çıkarılması garanti edilememektedir. Bu nedenle bitki ıslahçıları seleksiyon aşamasını kısaltacak daha etkili yeni yöntemler geliştirmişlerdir. İstenilen bir özellikle ilişkili moleküler markörlerin geliştirilmesiyle fenotipik özelliklerin

genotipik olarak belirlenmesi sağlanarak (markör destekli seleksiyon yöntemi geliştirilerek) bitki ıslahında önemli alanlarda kullanılmaktadır. Bu yöntem bitki ıslahında hızlandırılmış seleksiyon stratejileri geliştirilerek yeni çeşitlerin geliştirilmelerine olanak sağlamıştır (Korzun, 2002).

Bu moleküler markörlerin kullanımı türler arasında veya içinde DNA sekans varyasyonunu gözleyerek yeni genetik varyasyon kaynaklarının bulunması için kullanılmaktadır. Markör destekli seleksiyonda iki ebeveynin melezlenmesinden oluşturulan bitki popülasyonunda istenilen genlerle ilişkili markörler tespit edilerek bunların ıslah çalışmalarında erken seleksiyon kriteri olarak kullanmak veya bu markörlerden hareketle ilgili genlerin klonlanmasının sağlanması amaçlanmaktadır. Ayrıca MAS, kantitatif özelliklerin seleksiyonu ve kalıtım mekanizmasının araştırılmasında, moleküler bağlantı haritalarının oluşturulmasında ve tamamlanmasında da potansiyel olarak karşımıza çıkmaktadır (Knapp, 1994).

Markör destekli seleksiyon Tospovirüslere karşı dayanıklılık geliştirmek amacıyla domatese yapılan ıslah çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu konuda yapılan MAS çalışmaları aşağıda özetlenmiştir.

2.4. Domateste Sw-5 geniyle ilgili MAS çalışmaları

Polonya’da yapılan bir çalışmada 271 primer kullanılarak üç farklı özelliğe sahip domates çeşidinde (Stevens x Rodade - dirençli; Rey de los Tempranos – tolerant; Potentat – duyarlı) RAPD analizleri yapılmıştır. Kullanılan 71 primerden 28 tanesi bu bitkilerde sürekli polimorfizm oluşturmuş ve bunların dayanıklılık geniyle ilişkili olduğu test edilmiştir. Dayanıklı ve duyarlı bireylerden oluşturulan F2 bireyine bulk segregant analizi (BSA) uygulanmıştır. Sonuç olarak kullanılan primerlerden 5 tanesi dayanıklı ve duyarlı çeşitler arasında farklılık göstererek bunların birbirinden ayrılmasını sağlamıştır. Bu primerlerden sadece biri 1996’da Chague tarafından rapor edilmiş olmasına rağmen diğer dördünün dayanıklılıkla duyarlı bitkileri ayıran yeni primerler olduğu belirtilmiştir (Smiech et al., 2000).

Yapılan diğerk bir çalışmada taze pazar için (Poly 39) ve işlenmek (AD-17) için uygun üstün özellikler gösteren ancak TSWV'ne duyarlı olan iki domates hattına sw-5 geninin markör destekli seleksiyonu yapılarak dayanıklılık ıslahı uygulanmıştır. Bu amaçla bu her iki hat TSWV'ne karşı direnç veren sw-5 genini içeren Stevens çeşidiyle melezlendikten sonra bir geri çaprazlama programı yapılmıştır. Geri aprazlama programında dayanıklı bireylerin seçilmesinde sw-5 dayanıklılık genine çok yakından bağlı olan CAPS (Folkertsma ve ark., 1999) marköründen yararlanılmıştır. Bu markörün eş baskın (co-dominant), özellikte olması dayanıklı bireylerin belirlenmesinin yanında dayanıklı bireylerin heterozigot mu yoksa homozigot dayanıklı mı olduklarını belirleyerek geri çaprazlamaların aşamalarında istenilen özellikte ve dayanıklı bitkileri seçmek amacıyla etkili bir Şekilde kullanılmıştır. Çalışmada ayrıca dayanıklılık kazandırılan her iki elit hattın sw-5 dayanıklılık genlerini fonksiyonel olarak taşıdıklarını göstermek ve dayanıklılığın başarılı bir Şekilde bu hatlara aktarıldığını onaylamak için TSWV'yle aşılama testi yapılarak elde edilen hatların dayanıklılık durumları teyit edilmiştir (Langella et al., 2004).

Avustralya'da yapılan bir çalışmada daha önceden geliştirilen ve sw-5 geniyle bağlantılı olduğu belirlenen CT220 markörüne ek olarak sw-5b geninin LLR (leucine-rich repeat) motifine spesifik yeni bir markör geliştirilerek domates çeşitlerinin taranmasında kullanılmıştır. Geliştirilen LRR ve CT220 markörlerine spesifik primerler bir arada kullanılarak test edilen bitkilerden LLR için 300 bp CT220 için ise 200 bp byklğnde bantlar çoğaltılarak bitkilerde sw-5 geninin varlığı belirlenmiştir. Geliştirilen ikili markör sisteminde gerek duyulduğunda dayanıklı bitkilerin genotipleri belirlenerek homozigot ve heterozigot bireyler ortaya konulabilmektedir. Bu amaçla PCR sonucunda elde edilen LLR ve CT220 PCR ürünlerine daha sonra *AseI* enzimiyle kesilmiş ve uygulamadan sonra DNA'lar analiz edildiğinde 300bp byklğndeki LRR bantları, 200bp byklğndeki kesilmemiş CT220 bantları ve yaklaşık 100 bp byklğndeki kesilmiş 2, CT220 fragmentleri tespit edilmiştir. 300 ve 200 bp bantlar dayanıklılığı 100 bp ise duyarlılığı

gösterirken hepsinin birden bulunması ise bitkinin heterozigot olduğunu göstermiştir. Bu şekilde 50 farklı domates çeşidini test edilmiş ve bunlardan 34 tanesi dayanıklı bulunurken 16 tanesi ise duyarlı çıkmıştır (Garland et al., 2005).

TSWV tütünde de hastalığa yol açarak önemli kayıplara neden olmaktadır. Bu nedenle TSWV'ne dayanıklılık kaynakları araştırılarak *Nicotiana glauca* çeşidinde dayanıklılığın bulunduğu ve virüse dayanıklılığın tek bir dominant genle sağlandığı belirlenmiştir. Daha sonra bulunan dayanıklılık geni klasik melezleme ve geriye melezleme yoluyla ticari tütün çeşitlerine aktarılmıştır. TSWV'ne dayanıklılık sağlayan tek bir dominant gene sahip tütün çeşitlerinden biri olan 'Polalta' ve duyarlı tütün türlerinde bulk segregant analiz (BSA) yöntemi kullanılarak dayanıklılıkla ilişkili AFLP markörleri belirlenmiştir. Dayanıklılıkla ilişkili olduğu belirlenen 4 AFLP markörlerinin daha sonra dizilimi yapılarak başarılı bir şekilde büyük ölçekli uygulamaya uygun SCAR markörüne dönüştürülmüştür. Geliştirilen bu markörlerin TSWV'ne dayanıklı tütün çeşitlerinin ıslahını hızlandırarak dayanıklı tütün çeşitlerinin gelişmesini kolaylaştırabileceği düşünülmektedir (Moon and Nicholson, 2007). Sw-421 TSWV'ne dayanıklılık sağlayan sw-5 geniyle bağlantılı bir SCAR (sequence characterized amplified region) markörü olup TSWV'ne dayanıklılık içeren *Lycopersicon peruvianum* (L.)'da bulunan sw-5 geninin 1.0 cM uzaklığında bulunmaktadır. Bu markör daha önceden belirlenip sw-5 dayanıklılık taşıyan domates çeşitlerinin belirlenmesinde ilk kullanılan markör olmasına rağmen henüz gelişmiş domates popülasyonlarında test edilmemiştir. Çalışmanın amacı 'sw-421' SCAR markörü kullanarak sw-5 dayanıklılık geni içeren Stevens domates çeşidi ile çaprazlanmış ve daha sonra geri çaprazlanmış popülasyonlardaki dayanıklı homozigot (sw-5/sw-5) ve heterozigotları (sw-5/sw-5*) duyarlı homozigot (sw-5*/sw-5*) bitkilerden ayırt etmektir. Sırasıyla 940 bp ve 900 bp bantlarının amplifikasyonu dayanıklı homozigot ve duyarlı homozigot kontrolleri karakterize etmekte buna karşın her iki bandın birlikte bulunması ise bitkilerin heterozigot olduğunu göstermektedir. Bant desenlerine dayanarak 57 bitki sw-421 SCAR markörüne spesifik primerler kullanılarak sw-5 geni açısından analiz edilerek karakterizasyonları yapılmıştır. Bu bitkilerden 18'i (%31,6) dayanıklı homozigot, 8'i (%14) dayanıklı heterozigot ve 31'i ise (% 54,4) duyarlı homozigot olarak belirlenmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgular SCAR 'sw-421' markörünün ıslahta

ve dayanıklılık allellerinin piramidinin oluşturulmasında önemli bir araç olacağını göstermiştir (Nascimento et al., 2009).

Domateste Tospoviruslere karşı şimdiye kadar bildirilen en geniş spektrumlu dayanıklılık sw-5 lokusu tarafından sağlanmaktadır. Bu lokus sw-5a'dan sw-5e'ye kadar en az beş homolog gen içermektedir. Bu genlerden Sw-5b asıl dayanıklılık genini temsil etmektedir. Brezilya ve Hollanda işbirliğiyle yapılan bu çalışmada sw-5a ve sw-5b gen bölgesi kapsayan bir genom bölgesinde farklı dizilerdeki 7 çift PCR primeri domateste sw-5 geninin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Kullanılan primerlerden biri Sw5-2 sadece dayanıklı bitkilerde tek bir eş baskın (co-dominant) bant üreterek sw-5 genini içeren ve içermeyen domates çeşitlerinin ayrımını sağlamıştır. Primerlerle çoğaltılan DNA'ların dizilimleri belirlenip analizleri edildiğinde çoğaltılan bantların sw-5 lokusuna spesifik olduğunu DNA büyüklüklerinde küçük varyasyonlar bulunduğunu ve aralarındaki farkların baz ekleme ve çıkarmalardan kaynaklandığını göstermiştir. Dayanıklı ve dayanıksız çeşitlerin ayrımını gösteren primerlerle çoğaltılan bölgenin fonksiyonel sw-5b geninin promotör bölgesinin -31 pozisyonundan genin içine kadar uzandığı belirlenmiştir. Geliştirilen bu primer kullanılarak arazide yetiştirilen ve Tospovirus dayanıklılığı bilinmeyen domates çeşitlerinde ve dayanıklılık durumu bilinen domateslerin belirlenmesinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Elde edilen bulgular geliştirilen sw-5-2 primer setinin tospovirüs dayanıklılığını sera ve arazi koşullarında etkin bir şekilde belirlediğini ve markör yardımıyla seleksiyon için iyi bir markör olduğunu göstermiştir (Dianese et al., 2010).

Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde (BATEM) yapılan bir çalışmada gen havuzunda bulunan bazı domates hatları ile Sw-5 geni taşıyan dayanıklı LA 3667 domates hattı ve yine dayanıklı ticari bir çeşit olan Formula F₁ kullanılarak sw-5 geniyle bağlantılı markör taraması yapılmıştır. Test edilen domates hat ve çeşitlerinde Sw-5 geninin varlığını tespit etmek için CAPS markörü kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda Sw-5 geni taşıyan dayanıklı LA 3667 domates hattı ve Formula F₁ çeşidinde Sw-5 gen bölgesi ile ilişkili olduğu bilinen 300 bp'lık DNA

bandı çoğaltılırken BATEM gen havuzunda bulunan domates hatları içerisinde Sw-5 genine spesifik 300 bp'lık bant tespit edilememiştir (Oğuz ve ark., 2010).

Mersin ilinde yapılan bir çalışmada Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü domates gen havuzunda bulunan 350 adet domates hattı SCAR markörüne spesifik Sw-5-2 primeri kullanılarak taranmıştır. Sonuç olarak 27 adeti dayanıklı olarak bulunmuştur (Pınar ve ark., 2011).

Ülkemizde domateste markör destekli seleksiyon (MAS) ile ilgili çok sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır. Ülkemizde yetiştirilen domates çeşitlerinin sayısı ve domatesin ülkemiz açısından ekonomik değeri göz önünde bulundurulursa bu çalışmaların ne kadar değerli olduğu anlaşılmaktadır. Ülkemizde TSWV' nün varlığı ve yaygınlığı bilinmesine rağmen bu hastalığa karşı dayanıklılık geliştirmeye yönelik fazla bir çalışma bulunmamakta yapılan çalışmalarda ise MAS yönteminden çok fazla yararlanılmamaktadır. Bu çalışmada ülkemizde faaliyet gösteren firmalardan temin edilen 71 farklı domates çeşidinin TSWV 'ne karşı dayanıklılık sağlayan Sw-5 genini taşıyıp taşımadıklarına göre bu çeşitlerin TSWV'ne dayanıklılık durumları ortaya konulmuştur.

3. MATERYAL ve YÖNTEM:

3.1. Bitki Materyali:

Çalışmanın bitki materyalini ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen yazlık, kışlık domates çeşitlerinden TSWV'ne dayanıklı olduğu bilinen, bilinmeyen veya düşünülen 71 farklı domates çeşidi tohumları oluşturmuştur. Bu tohumlar ülkemizde faaliyet gösteren yerli ve yabancı 8 tohum firmasından sağlanmış olup tohum firmalarının haklarının korunması açısından firmaların isimleri verilmeyip A, B, C, D, E, F, G, H firmaları olarak isimlendirilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan domates çeşitleri ve TSWV 'ne dayanıklılık durumları

FİRMA	Çeşit numarası	Çeşit ismi	TSWV'ne dayanıklılık
A Tohumculuk	1	Ag013	Bilinmiyor
	2	Ag102	Bilinmiyor
	3	Ag103	Bilinmiyor
	4	Ag192	Bilinmiyor
	5	Ag194	Bilinmiyor
	6	Ag368	Bilinmiyor
	7	Ag623	Bilinmiyor
	8	Ag633	Bilinmiyor
	9	Ag740	Bilinmiyor
	10	Ag750	Bilinmiyor
	11	Ag949	Bilinmiyor
B Tohumculuk	12	Manyla	Dayanıklı
	13	Elenora	Duyarlı
	14	Lisa	Dayanıklı
	15	Calipso	Duyarlı
	16	Herkül	Duyarlı

	17	Sagaro	Dayanıklı
	18	Nora	Duyarlı
	19	Meryva	Bilinmiyor
	20	Bonus	Duyarlı
C Tohumculuk	21	Rio grande	Duyarlı
	22	H-2274	Duyarlı
	23	Biokan	Duyarlı
	24	NS77	Duyarlı
D Tohumculuk	25	Alida	Bilinmiyor
	26	Allegro	Duyarlı
	27	Alsancak	Duyarlı
	28	Alyans	Duyarlı
	29	Aspava	Duyarlı
	30	Azra	Duyarlı
	31	Ceylin	Duyarlı
	32	Esin	Dayanıklı
	33	İkram	Bilinmiyor
	34	Jadelo	Bilinmiyor
	35	Karakaya	Duyarlı
	36	Linda	Duyarlı
	37	M-16	Duyarlı
	38	M-19	Duyarlı
	39	Malike	Bilinmiyor
	40	Maydo	Duyarlı
	41	Swanson	Dayanıklı
	42	Vuslat	Duyarlı
	43	191	Dayanıksız
	E Tohumculuk	44	Fenike
45		Klass	Dayanıklı
46		Limyra	Duyarlı
47		Natura	Duyarlı

	48	Ninja	Duyarlı
	49	Pegasus	Duyarlı
	50	Sipahi	Duyarlı
	51	Tayfun	Dayanıklı
F Tohumculuk	52	Agrotek09	Duyarlı
	53	Agrotek16	Duyarlı
	54	Agrotek28	Duyarlı
	55	Agrotek79	Duyarlı
	56	Agrotek89	Duyarlı
	57	Agrotek2099	Duyarlı
G Tohumculuk	58	T6307	Dayanıklı
	59	Ax480 380	Dayanıklı
	60	42051	Dayanıklı
	61	72986	Dayanıklı
	62	42078	Dayanıklı
	63	42139	Dayanıklı
	64	72211	Dayanıklı
	65	3337	Dayanıklı
	66	42162	Dayanıklı
	67	6305	Dayanıklı
	68	72065	Dayanıklı
H Tohumculuk	69	Erika	Bilinmiyor
	70	Yağmur	Duyarlı
	71	41-23	Duyarlı

3.2. Domates Bitkilerinin Yetiştirilmesi:

Kullanılan domates (*Lycopersicon esculentum*) çeşitlerinin tohumları, 2:1:1 oranında torf:toprak:gübre karışımı içeren viyollere ekilerek her bir çeşit viyoller üzerinde etiketlenmiştir. Ekim yapılan viyoller Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümündeki iklim odalarında 25-26 °C sıcaklık, % 60 nem ve 16 saat fotoperiyot uygulaması altında tutularak domates fideleri yetiştirilmiştir. Fideler düzenli olarak sulanıp gübrelenerek yaprak örnekleri alınana kadar aynı ortam ve koşullarda yetiştirilmeye devam edilmiştir. Yetiştirilen domates fideleri Şekil 3:1’de gösterilmektedir. Bitkilerden 3-5 yaparak örneği alınarak kullanılıncaya kadar -80 °C’de dondurularak veya kurutulduktan sonra 4 °C’de saklanmıştır.



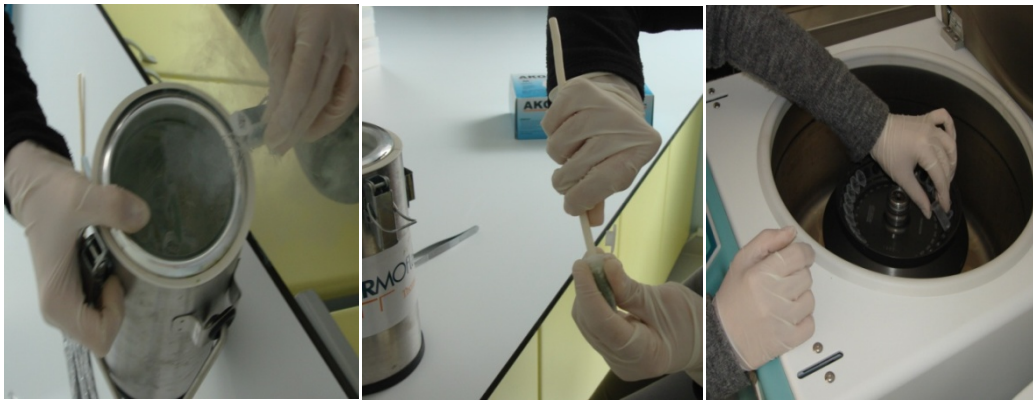
Şekil 3.1. İklim odalarında viyollerde yetiştirilen domates çeşitleri fideleri

3.3. DNA İzolasyonu:

Dondurularak veya kurutularak saklanan ve farklı domates çeşitlerine ait yaprak örneklerinden genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA izolasyon yöntemi olarak daha önce rapor edilen ve birçok bitkide de başarılı bir şekilde genomik DNA

izolasyonu elde etmek amacıyla kullanılan bir yöntem olan CTAB nükleik asit izolasyonu yöntemi kullanılmıştır.

Bu amaçla yaklaşık 100 mg yaprak örneği 1.5 ml'lik eppendorf tüplerinde 1 ml CTAB (%2 CTAB, %2 PVP-40, 100 mM Tris-HCl, pH8, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA ve %0.2 mercaptoethanol) solüsyonu içerisinde ezici çubuklar yardımı ile ezilmiştir. Ezilerek CTAB içerisinde homojenize edilen doku örnekleri vorteksle iyice karıştırılmıştır. Örnekleri içeren tüpler -20°C'de 5-15 dk bekletilerek dondurulduktan sonra vortekste en yüksek hızda en az 60 sn karıştırılmıştır. Elde edilen homojenat 65 °C'de en az 15 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra 10.000 g'de 5 dk süreyle santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında 650 µl supernatant alınarak yeni bir 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne eklenmiş ve üzerine eşit hacimde 24:1 kloroform izoamil alkol karışımı eklenerek 15.000 g'de 10 dk süreyle santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında 500 µl supernatant alınarak 350 µl izopropanol içeren yeni bir 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne eklenmiş ve karışım 15.000 g'de 10 dk süreyle santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra sıvı kısım dökülerek elde edilen pelet 1 ml %70'lik etanol ile yıkanmıştır. Karışım 15.000 g'de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra sıvı kısım dökülerek tüpler oda sıcaklığında 10-15 dk kurutulmuştur. Kurutulan peletler 100 µl, 20 mM Tris-HCl, pH 8 solüsyonu ile çözdürüldükten sonra -20°C'de saklanmıştır. CTAB total nükleik asit izolasyonunun bazı aşamaları Şekil 3.2'de gösterilmektedir.



Şekil 3.2. CTAB nükleik asit izolasyonunun aşamaları A) Dokuların sıvı azot içerisinde dondurulması B) Ezici çubuklarla dondurulmuş dokuların ezilmesi C) Santrifüj uygulaması

3.4. Primerler:

Daha önce Sw-5 lokusuyla bağlantılı bulunan markörlerin çoğaltılması amacıyla geliştirilen ve TSWV'ne dayanıklılığın belirlenmesinde başarılı bir şekilde kullanıldıkları literatürde belirtilen primerlerden yararlanılmıştır. Bu primerler MSC18SrRNA (Şahin Çevik ve ark., 2008) kontrol primerleri, Sw-5-2 (Dianese ve ark., 2010) primerleri ve CT220 (Garland ve ark., 2005) primerleri kullanılmıştır. Ayrıca daha önce rapor edilen genlerin Sw-5 lokusuna veya lokusta yer alan genlerden sadece sw-5b ye spesifik olmasından dolayı bu çalışmada Sw-5 lokusunda bulunan 5 farklı sw-5 geninin ayrılması amacıyla gen bankası veri tabanında bulunan Sw-5a, Sw-5b, Sw-5c, Sw-5d, Sw-5e genleri karşılaştırılarak tüm Sw-5 genlerinde korunmuş ancak hepsinden farklı büyüklükte DNA parçaları çoğaltılan bir çift primer tasarlanarak Sw-5 lokusunu taşıyan çeşitlerin hangi Sw-5 genini taşıdıklarının belirlenmesi de amaçlanmıştır. Literatürden alınarak yararlanılan ve bu çalışma kapsamında tasarlanan primerlerin dizisi ve özellikleri Tablo 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Yapılan çalışmada kullanılan primerlerin adı, baz dizisi ve alınan kaynak

Primer Kodu	Primer Dizisi	Kaynak
MSC5818S rRNA F	TTAACGAGGATCCATTGGAGGGC	Şahin Çevik ve ark. 2008
MSC5918SrRNA R	TACTAGGAATTCCTCGTTGAAGACC	Şahin Çevik ve ark. 2008
BC87 Sw-5-2F	AATTAGGTTCTTGAAGCCCATCT	Dianese ve ark. 2010
BC88 Sw-5-2R	TTCCGCATCAGCCAATAGTGT	Dianese ve ark. 2010
BC89 Sw5-a-e F	TATGCCACAGAGATAAATGG	Bu çalışma
BC90 Sw5- a-e R	TGGTAATTTCTTGTCTTGA	Bu çalışma
BC145 CT220 F	TCTTATATTGTGGAGTTTTGTCTG	Garland ve ark. 2005
BC146 CT220 R	TCCACCCTATCAAATCCAAC	Garland ve ark. 2005

3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Domates bitkilerinden elde edilen DNA örneklerinin her biri elde edilen DNA'nın PCR'a uygunluğunu belirlemek amacıyla 18S rRNA genine spesifik MSC primerleri ve TSWV dayanıklılık genini içeren sw-5 lokusuyla bağlantılı üç farklı marköre spesifik primerler kullanılarak PCR yöntemiyle test edilmiştir. Kullanılan her bir primer farklı PCR koşulları gerektirdiğinden PCR çalışmaları çoğaltılan gen veya markörlere göre ayrı ayrı açıklanmıştır.



Şekil 3.3. Yapılan PCR çalışmalarının aşamaları A) PCR karışımının hazırlanması
B) PCR makinesinde çoğaltım yapılması

3.5.1. Ribozomal RNA Genlerinin Çoğaltılması

Elde edilen genomik DNA'ların PCR çalışmalarına uygun olup olmadığını belirlemek amacıyla çalışmada kullanılan tüm domates bitkilerinden elde edilen genomik DNA'lardan 18S rRNA genine spesifik MSC58 ve MSC59 primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyon (PCR) yapılmıştır. Bu amaçla 1X PCR tampon solüsyonu, 0,5 µl DNA, 0.2 mM dNTP, 10 pmol MSC58 ve MSC59 primerleri ve 1.25 ünite Taq DNA Polimeraz ezimi (Fermantas) eklenerek hazırlanan karışım su ilave edilerek 25 µl'ye tamamlanmıştır. PCR makinesi önce 94°C'de 3 dakika ön denatürasyonu takiben 94°C'de 30 s denatürasyon 50 °C'de 30 s primer

bağlanması ve 72° C’de 1 dk polimerizasyon aşamalarının 40 defa tekrarlanmasının ardından 72°C’de 5 dk son polimerizasyon yaptıktan sonra +4°C’de sürekli kalacak şekilde programlanmıştır. Hazırlanan karışım PCR cihazına konularak belirtilen program uygulanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri aşağıda belirtildiği gibi agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırıldıktan sonra analiz edilmiştir

3.5.2. Sw-5 lokusuyla bağlantılı markörlerin çoğaltılması

Bu çalışma kapsamında TSWV’ne dayanıklı domates bitkilerinde bulunan sw-5 lokusuyla bağlantılı olarak bulunan ve geliştirilen farklı markörler kullanılmıştır. Daha önce rapor edilen markörlerden lokusla bağlantılı CT200 ve Sw-5b genine spesifik Sw5-2 markörleriyle ve bu çalışma kapsamında geliştirilen ve sw5 lokusundaki 5 farklı sw5 genini çoğaltabilen Sw-5 a-e markörleri kullanılmıştır. Bu markörlerin PCR yöntemiyle çoğaltım koşulları aşağıda verilmiştir.

3.5.2.1. CT220 markörünün çoğaltılması

Çalışmada kullanılan tüm domates bitkilerinden elde edilen genomik DNA’lardan CT220 markörüne spesifik BC145 ve BC146 primerleri kullanılarak PCR yapılmıştır. Bu amaçla daha önce rapor edilen PCR yöntemi (Garland ve ark. 2005) bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Bu amaçla 1X PCR tampon solüsyonu, 1 µl DNA, 0.2 mM dNTP, 20 pmol BC145 ve BC146 primerleri, 2.5 ünite Taq DNA polimeraz (Fermentas) ve 2.5 mM MgCl₂ içeren bir karışıma su ilave edilerek 50 µl karışım hazırlanmıştır. PCR makinesi 94°C’de 3 dakika ön denatürasyonu takiben 94°C’de 30 s denatürasyon 50 °C’de 30 s primer bağlanması ve 72° C’de 30 s polimerizasyon aşamalarının 40 defa tekrarlanmasının ardından 72°C 5 dakika son polimerizasyon yaptıktan sonra +4°C’de sürekli kalacak şekilde programlanmıştır. Hazırlanan karışım PCR cihazına konularak belirtilen program uygulanmıştır. Elde

edilen PCR ürünleri aşağıda belirtildiği gibi agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle analiz edilmiştir.

3.5.2.2. Sw5-2 markörünün çoğaltılması

Çalışmada kullanılan tüm domates bitkilerinden elde edilen genomik DNA'lardan Sw5-2 markörüne spesifik BC87Sw-5-2F ve BC88Sw-5-2R primerleri kullanılarak PCR yapılmıştır. Bu amaçla daha önce rapor edilen PCR yöntemi (Dianese ve ark. 2010) bazı küçük modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır. Öncelikle 1X PCR tampon solüsyonu, 1 µl DNA, 0.2 mM dNTP, 20 pmol BC87Sw-5-2F ve BC88Sw-5-2R primerleri, 2.5 ünite Taq DNA polimeraz (Fermentas) ve 2.5 mM MgCl₂ içeren bir karışıma su ilave edilerek 50 µl'lık PCR karışım hazırlanmıştır. PCR makinesi 94°C'de 3 dk ön denatürasyonu takiben 94°C'de 30 sn denatürasyon 55 °C'de 30 sn primer bağlanması ve 72° C'de 30 sn polimerizasyon aşamalarının 40 defa tekrarlanmasının ardından 72 °C 5 dk son polimerizasyon yaptıktan sonra +4 °C'de sürekli kalacak şekilde programlanmıştır. Hazırlanan karışım yukarıda belirtildiği gibi programlanan PCR cihazına konularak çoğaltım sağlanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri aşağıda belirtildiği gibi agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle analiz edilmiştir

3.5.2.3. Sw-5a-e markörünün çoğaltılması

TSWV'ne dayanıklılık sağlayan sw-5 lokusunun belirlenmesi amacıyla çalışmada kullanılan tüm domates bitkilerinden elde edilen genomik DNA'lardan sw-5 lokusunda bulunana Sw-5a, Sw-5b, Sw-5c, Sw-5d ve Sw-5e genlerine spesifik BC89Sw-a-e F BC90Sw5-a-e R primerleri kullanılarak PCR yapılmıştır. Bu amaçla 1X PCR tampon solüsyonu, 1 µl DNA, 0.2 mM dNTP, 20 pmol BC89Sw-a-e F BC90Sw5-a-e R primerleri 2.5 ünite Taq DNA polimeraz (Fermentas) ve 2.5 mM MgCl₂ içeren bir karışıma su ilave edilerek 50 µl karışım hazırlanmıştır. PCR

makinesi 94°C’de 3 dk ön denatürasyonu takiben 94°C’de 30 sn denatürasyon 50-55°C’de 30 sn primer bağlanması ve 72° C’de 30 sn polimerizasyon aşamalarının 40 defa tekrarlanmasının ardından 72°C’de 5 dk son polimerizasyon yaptıktan sonra +4°C’de sürekli kalacak şekilde programlanmıştır. Hazırlanan karışın PCR cihazına konularak belirtilen program uygulanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri aşağıda belirtildiği gibi agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle analiz edilmiştir.

3.6. Agaroz Jel Elektroforezi

Farklı primer setleriyle elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforez yöntemiyle ayrıştırılarak analiz edilmiştir. Bu amaçla %1,5 agaroz jelinin hazırlanması için 1,5 g agaroz (Sigma) 100 ml 1X TAE (Tris-acetate-EDTA) tamponu içerisinde mikrodalga fırında ısıtılarak çözdürülmüştür. Çözdürülen agaroz biraz soğutulduktan sonra içerisine 1 µl 10 mg/ml Ethidyum bromür eklenip iyice karıştırıldıktan sonra jel ünitesine (BioRad) dökülerek tarakları takılmıştır. Agaroz jeli katılaştıktan sonra taraklar çıkartılarak jel 1X TAE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirilmiştir. PCR ürünlerinden 10 µl alınarak 2 µl 6X yükleme boyasıyla karıştırıldıktan sonra (Biobasic, CA) agaroz jeline yüklemiştir. Jelin sonuna ve/veya başına 100 bp DNA büyüklük markörleri de yüklenerek jel 30-60 dk süreyle 100 V elektrik akımı uygulanarak elde edilen PCR ürünleri elektroforez yöntemiyle ayrıştırılmıştır. Ayrıştırılan PCR ürünleri daha sonra Mini BIS-Pro (DNR, İsrail) görüntüleme cihazında ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir.

3.7. Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)

Bu çalışmada tasarlanarak Sw-5 lokusuna spesifik markör geliştirmekte kullanılan BC89Sw-a-e F BC90Sw5-a-e R ile yaklaşık 230-300 bp uzunluğunda bant veya bantlar çoğaltılması amaçlanmıştır Bu primerlerle sw-5 lokusunda bulunan sw-5a sw-5b sw-5c, sw-5d ve sw-5e genleri için sırasıyla, 278 bp, 258 bp, 232 bp, 284 bp ve 308 bp büyüklüğünde bantlar çoğaltması gerekmektedir. Ancak bantların büyüklüklerinin birbirine yakın olmasından dolayı yukarıda belirtilen şekilde agaroz

jel elektroforeziyle ayrıştırılarak aralarındaki farkların görülmesi mümkün değildir. Bu nedenle sw-5 lokusuna sahip bitkilerin hangi sw-5 genlerini taşıdıklarını belirlemek amacıyla BC89Sw-a-e F BC90Sw5-a-e R primerlerinin kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin çözünürlüğü çok daha yüksek olan poliakrilamid jelinde ayrıştırılarak analiz edilmeleri gerekmektedir. Bu nedenle yapılan çalışmadan daha kesin bir sonuç almak ve daha net bir skorlama yapabilmek açısından BC89Sw-a-e F BC90Sw5-a-e R primerleri kullanılarak elde edilen PCR ürünleri %10 poliakrilamid jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılmıştır. Elektroforez işleminden sonra jel gümüş nitratla boyanarak çoğaltılan bantlar analiz edilmiştir.

3.7.1. Poliakrilamid Jelin Hazırlanışı

10X TBE (Tris-borate-EDTA) buffer, %40 poliakrilamid, TEMED (Tetramethylethylenediamine), %10 amonyum persulfate karışımı stoklarından 3 ml TBE buffer, 7,5 ml poliakrilamid, 30 µl TEMED ve 300 µl amonyum persulfate alınarak hazırlanan karışımın hacmi steril su ile 30 ml'ye tamamlanarak jel karışımı hazırlanmıştır. 20-25 boyutlarında poliakrilamid jel dikey elektroforez ünitesi kurulduktan sonra hazırlanan jel karışımı kalıba dökülerek %10'luk poliakrilamid jel hazırlanmıştır. PCR ürünlerinden 10 µl alınarak 2 ul 6X yükleme boyasıyla karıştırıldıktan sonra jele yüklenmiştir. Jel 16 saat süreyle 50 V elektrik akımı uygulanarak örnekler jelde ayrıştırılmıştır.

3.7.2. Gümüş Boyama (Silver Staining)

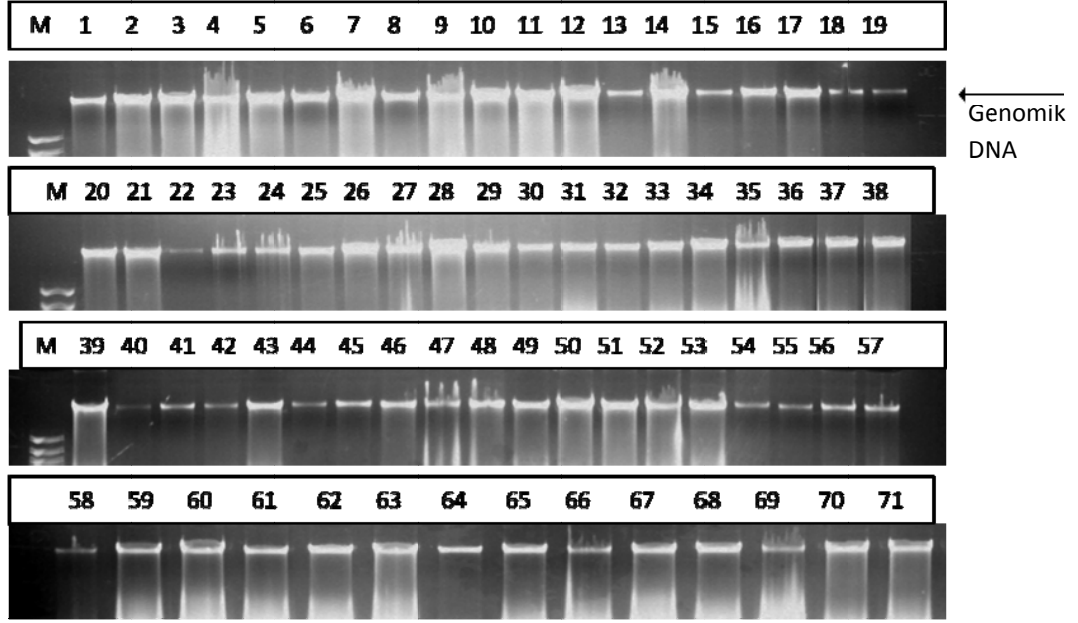
Poliakrilamid jelde ayrıştırılan DNA bantlarını görüntülemek amacıyla poliakrilamid jellerde hassas bir boyama sağlayan gümüş nitrat boyaması kullanılmıştır. Bu amaçla jel solüsyonu için 25 ml (%50) etil alkol ve 5 ml (%10) asetik asit karıştırılarak 20 ml steril su ile 50 ml'ye tamamlanan birinci sabitleme solüsyonu içerisine konulmuştur. Jel 30 dk sabitleme solüsyonu içerisinde çalkalanmıştır. Bu solüsyon döküldükten sonra 5ml etil alkol ve 0,5 ml asetik asit karıştırılarak su ile 50 ml'ye tamamlanan ikinci sabitleme solüsyonuyla 30 dk çalkalanmıştır. İkinci sabitleme solüsyonu da dökülüp 50 ml su ve 0,1 gr gümüş nitrat (AgNO₃) karışımı ile 30-45 dk

alkalanmıştır. Bu işlem sırasında jelin bulunduğu kap alüminyum folyo ile sarılmıştır çünkü AgNO₃ ışığa duyarlıdır. AgNO₃ dökölüp jelin üzerine 100 ml steril su dökölerek hızlıca 2-3 kez elle çalkalanıp dökölmüştür. Jelin üzerine 50 ml developer solüsyonu (2,1 gr KOH 50 ml steril su içinde hazırlanır) eklenmiştir. Jelin bulunduğu kap hafif eğilerek solüsyon kabın bir köşesinde toplanıp ve jele değmeyecek şekilde 0,525 ml formaldehid (H-CHO) eklenip hızlıca elle çalkalanmıştır. Sıvılar karışınca bantlar belirginleşene kadar çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Bantlar belirginleşince jel beyaz bir zemin üzerine alınarak fotoğrafı çekilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. DNA İzolasyonu Sonuçları

Yapılan çalışmada ülkemizde faaliyet gösteren 8 farklı tohumculuk firmasından temin edilen TSVW'ne dayanıklı, dayanıksız, dayanıklılık durumu bilinmeyen 71 farklı domates çeşidinin fideleri yetiştirilmiştir. Yetiştirilen fidelerden yaprak örnekleri alınarak CTAB nükleik asit izolasyonu yöntemiyle genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda kullanılan bütün domates çeşitlerinden başarılı bir şekilde genomik DNA izolasyonları yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA'lar agaroz gel elektroforez yöntemiyle analiz edilerek görüntülenmiştir. Çalışmada kullanılan 1-71 numaralı domates örneklerinden DNA izolasyonu sonucunda elde edilen genomik DNA'lar Şekil 4.1.'de gösterilmekte olup tüm örneklerden benzer görüntü elde edilmiştir. Jel görüntüsü yakından incelendiğinde tüm örneklerden genomik DNA elde edilmesine rağmen elde edilen DNA miktarlarında farklılıklar görülmüştür. Bu farklılıkların başlangıçta alınan yaprak doku miktarlarındaki farklılıklardan veya izolasyon aşamalarındaki pipetleme farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Elde edilen DNA miktarlarında bazı küçük farklılıklar bulunsa da tüm örneklerden PCR'da kullanılacak saflık ve miktarda DNA elde edilmiştir.



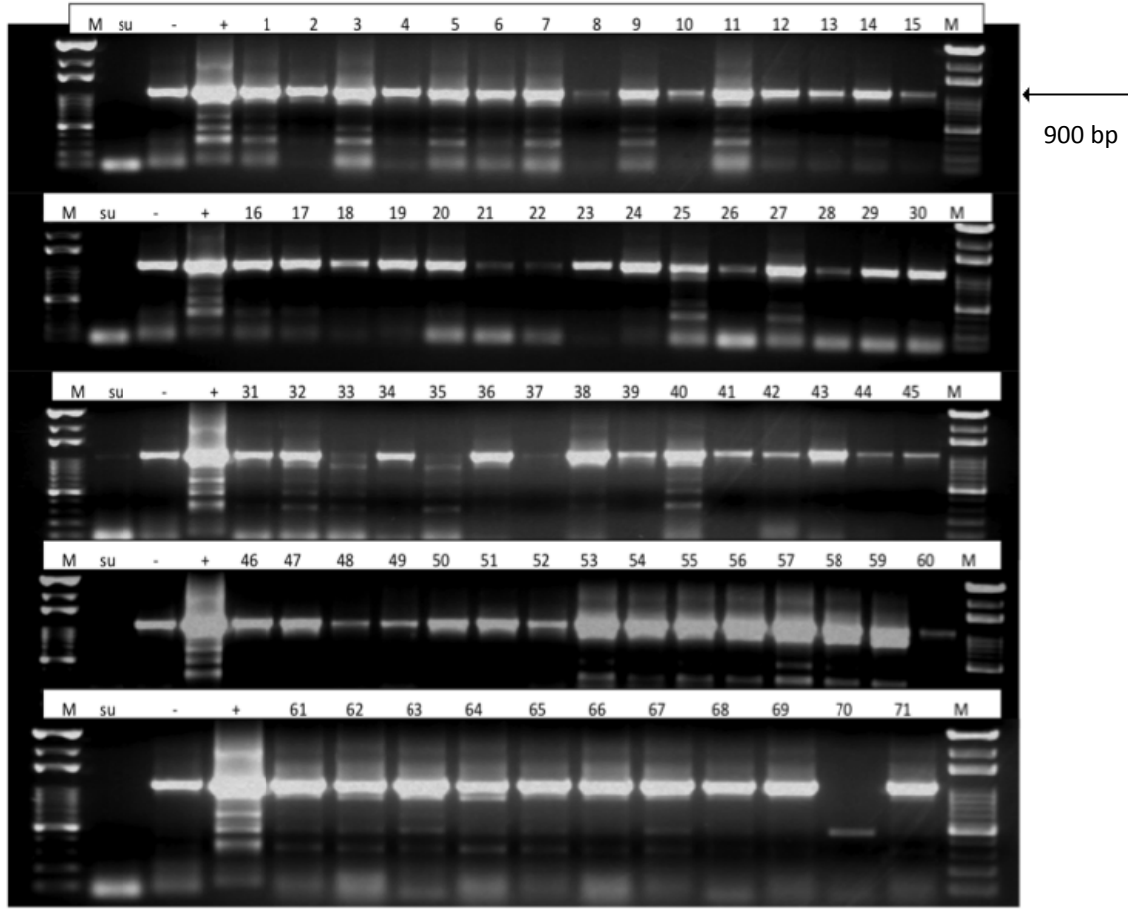
Şekil 4.1. 1-71 arası örneklerin genomik DNA izolasyonunu gösteren jel görüntüsü
M: 100 bp plus DNA büyüklük markörü, 1-71: Domates çeşitleri

4.2. PCR Analizleri

Çalışmada kullanılan 71 domates bitkisinden elde edilen genomik DNA örneklerinin her biri öncelikle elde edilen DNA'nın PCR'a uygunluğunu belirlemek amacıyla 18S rRNA geninin çoğaltılmasında kullanılmıştır. Örneklerin tamamı daha sonra TSWV'ne dayanıklılık genini içeren sw-5 lokusuyla bağlantılı Sw-5-2, Sw5-a-e, CT220 olmak üzere üç farklı marköre spesifik primerler kullanılarak PCR yöntemiyle test edilmiştir. Tüm PCR çalışmalarında hiç genomik DNA içermeyen su kontrolü, sw5 lokusu içermediği bilinen yerli çeşitlerden Ilgın'dan elde edilen genomik DNA negatif kontrol olarak, TSWV'ne dayanıklılık sağlayan Sw-5 lokusunu taşıdığı ön çalışmalarla belirlenen domates çeşitlerinden birisi (9. örnek) pozitif kontrol olarak tüm PCR çalışmalarında kullanılmıştır. Yapılan PCR çalışmalarının sonuçları her gen veya markör için aşağıda özetlenmiştir.

4.2.1. 18S Ribozomal RNA Genin PCR'la oğaltılması

Domates örneklerinden elde edilen genomik DNA'ların PCR çalışmalarına uygun olup olmadığını belirlemek amacıyla çalışmada kullanılan tüm domates bitkilerinden elde edilen genomik DNA'lardan 18S rRNA genine spesifik MSC58 ve MSC59 primerleri kullanılarak PCR yapılmıştır. Elde edilen PCR rnleri 100 bp plus DNA büyüklük markörüyle birlikte %1'lik agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırıldıktan sonra görüntülenmiştir. Yapılan PCR ve elektroforez çalışmaları sonucundan analiz edilen tüm domates çeşitlerinin ve kontrol bitkilerinin genomik DNA'larından 900 bp byklğinde 18S rRNA genine spesifik bir DNA oğaltılırken negatif kontrol olarak kullanılan ve hiçbir genomik DNA içermeyen ve sadece su içeren örnekten herhangi bir DNA oğaltılamamıştır. Çalışmada kullanılan tüm domates bitkilerinin 18SrRNA genlerinin çoğaltılması için MSC58 ve 59 primerleri kullanılarak yapılan PCR testinin sonuçları Şekil 4.2.'de gösterilmektedir. Jel fotoğrafları yakından incelendiğinde 70 numaralı örnek dışında kalan tüm domates çeşitlerinden 900 bp byklğinde 18SrRNA genine spesifik DNA bandının çoğaltıldığı görülmektedir. Domates rneklerinin tamamından aynı büyüklükte bir bant çoğaltılmasına rağmen çoğaltılan bantların yoğunluklarında ve spesifik olmayan bazı bantların oğaltılmış olması bakımından örnekler arasında bazı farklılıklar görülmüştür. Buna göre 8, 21, 22, 33, 35, 37, 60 numaralı örneklerin diğer örneklerle göre daha zayıf bant verdiği görülmüştür. Örnekler arasında görülen bant yoğunluğu farklılıklarının kullanılan genomik DNA miktarının azlığından veya fazlalığından ya da genomik DNA içerisinde bulunabilecek PCR engelleyicilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. PCR testinde 70 numaralı örnekten herhangi bir DNA oğaltılamamıştır. Bu durum genomik DNA olmamasından ya da genomik DNA içerisindeki bazı PCR engelleyici maddelerin olmasından kaynaklanabilir. Genomik DNA izolasyonunda 70 nolu örnekten yeterli miktarda DNA izolasyonunun yapıldığının belirlenmesi 18SrRNA geninin bu örnekten oğaltılmama nedeninin DNA saflığından kaynaklandığı sanılmaktadır. Elde edilen bulgular domates örneklerinden izole edilen genomik DNA'ların biri hariç tamamının PCR çalışmalarına uygun olduğu ve markör taramalarında kullanılabileceğini göstermiştir.

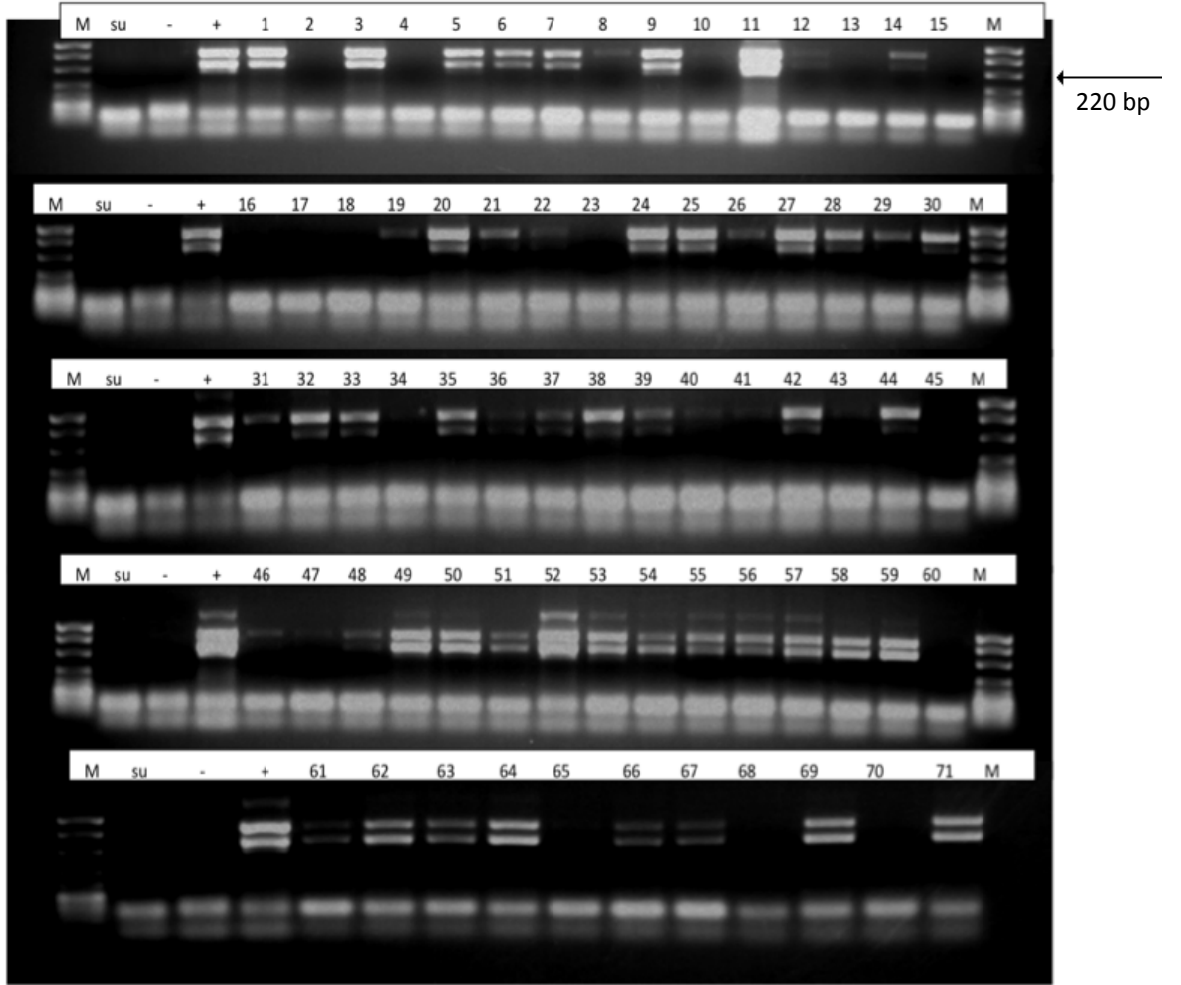


Şekil 4.2. 18S rRNA genine spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR sonuçlarının jel görüntüsü M: 100 bp plus DNA büyüklük markörü, Su: s negatif kontrol olarak kullanılan ve DNA içermeyen su kontrolünü, -: negatif kontrol olarak kullanılan sw-5 lokusu içermeyen domates çeşidini +:pozitif kontrol olarak kullanılan ve sw-5 lokusu içerdiği bilinen domates çeşidini 1-71 arasındaki sayılar: Çizelge 3.1de gösterilen domates çeşitlerini göstermektedir.

4.3. CT220 Markörünün Çoğaltılması

Çalışmada kullanılan tüm domates bitkilerinden elde edilen genomik DNA'lardan CT220 markörüne spesifik primerler kullanılarak PCR yapılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalardan bu primer setinin sw-5 lokusuna sahip bitkilerde 220 bp büyüklüğünde bant vereceği sw-5 lokusu taşımayanlarda ise 220 bp uzuluğunda bu bantın üretilmediği belirlenmiştir. Bu çalışmada CT220 markörüne spesifik primerlerle yapılan PCR sonucunda elde edilen ürünler 50 - 500 bp DNA büyüklük

markörüyle birlikte %1.5'lik agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırıldıktan sonra görüntülenerek 200 bp uzunluğundaki DNA bandının çoğaltılıp çoğaltılmadığı belirlenmiştir. Yapılan PCR ve elektroforez çalışmaları sonucundan analiz edilen domates çeşitlerinin bazılarında ve pozitif kontrol bitkilerinin genomik DNA'larından 200 bp büyüklüğünde CT220 markörüne spesifik bir DNA çoğaltılırken negatif kontrol bitkisinden ve hiçbir genomik DNA içermeyen ve sadece su kontrolünden ve bazı domates örneklerinden herhangi bir DNA çoğaltılamamıştır. Sw-5 lokusuyla bağlantılı CT220 markörüne spesifik primerlerle yapılan PCR sonucunda elde edilen PCR ürünleri Şekil 4.3.'de gösterilmektedir. Yapılan analizler sonucunda kullanılan örneklerin 45 tanesinden (1, 3, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 14, 20, 24, 25, 27, 28, 30, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 42, 44, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 63, 64, 66, 67, 69, 71) 200 bp büyüklüğünde CT220 markörüne spesifik bir DNA ile 300 bp uzunluğunda başka bir DNA parçası çoğaltılmıştır. Çoğaltılan bantların yoğunlukları örnekler arasında bazı farklılıklar gösterse de 200 bp uzunluğundaki CT220 spesifik bant yukarıda belirtilen 45 örneğin tamamında açıkça görülmekte olup örneklerin sw-5 lokusunu taşıdıklarını göstermektedir. Buna karşın 12 domates örneğinden (2, 4, 15, 16, 17, 18, 23,45, 60, 65, 68 ve 70 nolu örnekler) hiç bir DNA bandı çoğaltılamamıştır. Bu örneklerin genomik DNA'ları incelendiğinde yeterli miktarda genomik DNA içerdiği (şekil 4.1) ve 70 nolu örnek haricindeki tüm örneklerden 18S rRNA geni çoğaltıldığı (şekil 4.2) bu nedenle genomik DNA'ların PCR'a uygun olduğu görülmekte olup bu örneklerin sw-5 lokusunu taşımadıklarını göstermektedir. Bunun yanında yapılan PCR analizleri sonucunda 13 örnekten ise sadece 300 bp uzunluğunda CT220 markörüne spesifik olmayan bir DNA çoğaltılmış olup bu örneklerden PCR'a uygun genomik DNA izole edilmesine rağmen bunların CT220 markörüne spesifik 200 bp DNA bandını yani sw-5 lokusunu taşımadıkları belirlenmiştir. Bu sonuçlar test edilen 71 domates çeşidinden 45 tanesinin sw-5 lokusuna spesifik CT220 markörünü taşıdıkları ve dayanıklı olabileceğini, geriye kalan 25 tanesinin ise sw-5 lokusuna spesifik CT220 markörünü taşımadığını ve bu nedenle TSWV'ne dayanıklı olmadıklarını göstermiştir.

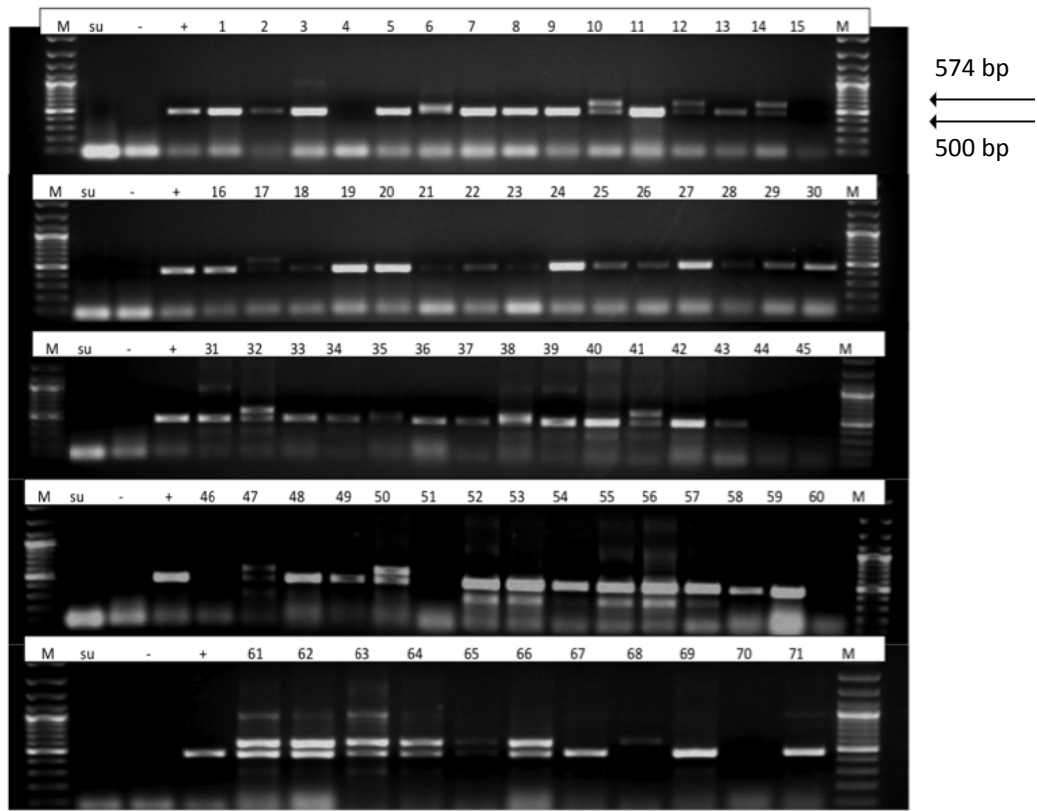


Şekil 4.3. CT220 markörüne spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR sonuçlarının jel görüntüsü M: 100 bp plus DNA büyüklük markörü, Su: s negatif kontrol olarak kullanılan ve DNA içermeyen su kontrolünü, -: negatif kontrol olarak kullanılan sw-5 lokusu içermeyen domates çeşidini +:pozitif kontrol olarak kullanılan ve sw-5 lokusu içerdiği bilinen domates çeşidini 1-71 arasındaki sayılar: Çizelge 3.1de gösterilen domates çeşitlerini göstermektedir.

4.4. Sw-5-2 Markörünün Çoğaltılması

Çalışmada kullanılan 71 domates bitkisinden elde edilen genomik DNA'ların tamamına Sw5-2 markörüne spesifik primerler kullanılarak PCR yapılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalar bu primer setinin sw-5 lokusuna sahip yani dayanıklı bitkilerden 574 bp büyüklüğünde bant üretirken sw-5 lokusu taşımayanlarda ise yaklaşık 510 bp veya 464 bp uzunluğunda bir DNA bandı çoğaltıldığı belirlenmiştir. Bu çalışmada Sw5-2 primerleriyle yapılan PCR sonucunda elde edilen ürünler 100 bp plus DNA büyüklük markörüyle birlikte 1.5%' luk agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırıldıktan sonra görüntülenerek 574 ve 510 veya 464 bp uzunluğundaki DNA bantlarının çoğaltılıp çoğaltılmadığı belirlenmiştir. Yapılan PCR ve elektroforez çalışmaları sonucundan analiz edilen domates çeşitlerinin bazılarında ve pozitif kontrol bitkilerinin genomik DNA'larından 574 bp büyüklüğünde Sw-5-2 markörüne spesifik bir DNA çoğaltılırken negatif kontrol bitkisinden ve hiçbir genomik DNA içermeyen ve sadece su kontrolünden ve bazı domates örneklerinden herhangi bir DNA çoğaltılamamıştır. Sw-5 lokusuyla bağlantılı Sw5-2 markörüne spesifik primerlerle yapılan PCR sonucunda elde edilen PCR ürünleri Şekil 4.4.'de gösterilmektedir. Yapılan analizler sonucunda kullanılan örneklerin 49 tanesinden (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 48, 49, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 67, 69, 71) 510 bp büyüklüğünde bir DNA parçası çoğaltılmıştır. Buna karşın test edilen 8 domates örneğinden (4, 15, 44, 45, 46, 51, 60, 70 nolu örnekler) hiç bir DNA bandı çoğaltılamamıştır. Bu örneklerin genomik DNA'ları incelendiğinde yeterli miktarda genomik DNA içerdiği (Şekil 4.1) ve 70 nolu örnek haricindeki tüm örneklerden 18S rRNA geni çoğaltıldığı (Şekil 4.2) görülmektedir. Bu nedenle bu örneklerden PCR'a uygun genomik DNA izole edilmesine rağmen bunların sw-5-2 markörüne spesifik 574 bp DNA bandını yani sw-5 lokusunu içermediklerini göstermiştir. Bunun yanında yapılan PCR analizleri sonucunda 14 örnekten ise 574 ve 510 veya 464 bp uzunluğunda Sw5-2 markörüne spesifik iki DNA bandı çoğaltılmış olup bu örneklerin Sw-5 geni bakımından heterozigot oldukları belirlenmiştir. Bu sonuçlar test edilen 71 domates çeşidinden 15 tanesinin sw-5 lokusunu taşıdıklarını ve bunlardan birinin (68. örnek) Sw-5 lokusu için

homozigot dominant diğeri 14 örneğinin (10, 12, 14, 17, 32, 41, 47, 50, 61, 62, 63, 64, 65, 66 numaralı örnekler) ise 574 bp DNA ve 510 veya 464 büyüklüğünde bantların her ikisi de çoğaltılmış olup bu bitkilerin Sw5-2 markörünü heterozigot olarak taşıdıkları ve dayanıklı olabileceklerini göstermektedir, Geriye kalan 42 tane domates çeşidinin ise sw-5 lokusuna spesifik Sw5-2 markörünü taşımadığı ve bu nedenle TSWV'e dayanıklı olmadıkları belirlenmiştir.



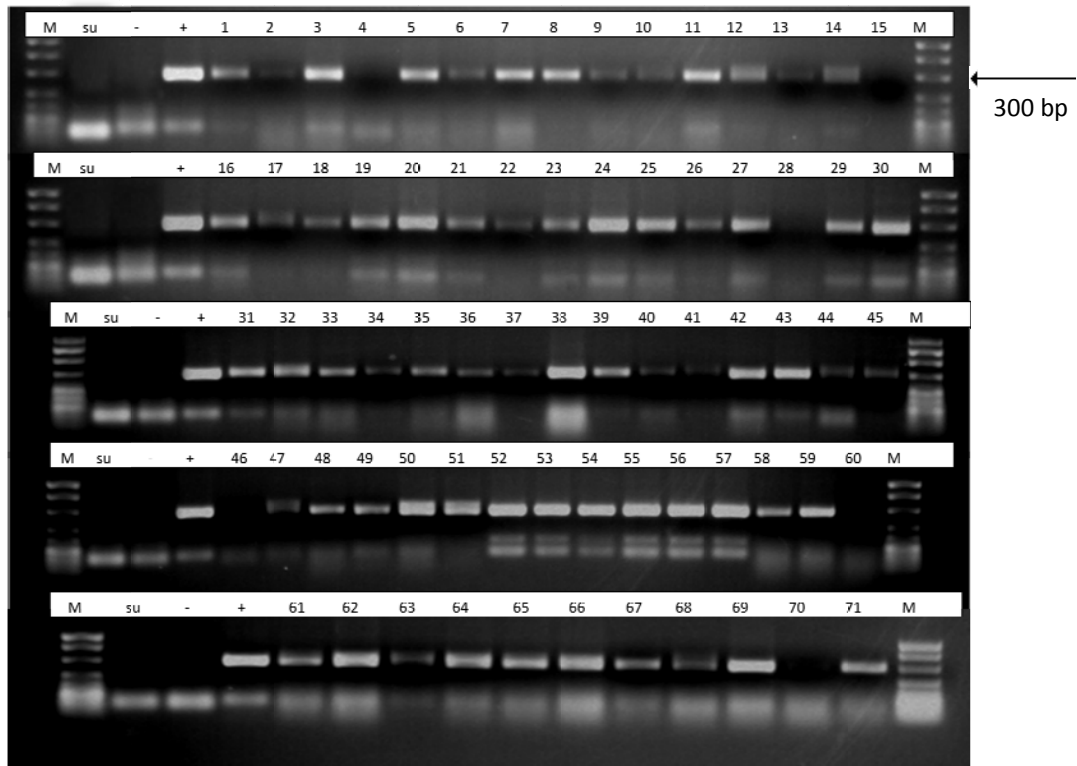
Şekil 4.4. Sw-5-2 markörüne spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR sonuçlarının jel görüntüsü M: 100 bp plus DNA büyüklük markörü, Su: s negatif kontrol olarak kullanılan ve DNA içermeyen su kontrolünü, -: negatif kontrol olarak kullanılan sw-5 lokusu içermeyen domates çeşidini +:pozitif kontrol olarak kullanılan ve sw-5 lokusu içerdiği bilinen domates çeşidini 1-71 arasındaki sayılar: Çizelge 3.1de gösterilen domates çeşitlerini göstermektedir.

4.5. Sw5-a-e Primerleriyle Yapılan PCR Sonuçları

TSWV dayanıklılığının belirlenmesi çalışmada kullanılan 71 domates bitkisinden elde edilen genomik DNA'ların tamamına Sw5-a-e markörüne spesifik primerler kullanılarak PCR yapılmıştır. Bu primerlerle sw-5 lokusunda bulunan sw-5a sw-5b sw-5c, sw-5d ve sw-5e genler için sırasıyla, 278 bp, 258 bp, 232 bp, 284 bp ve 308 bp büyüklüğünde bantların çoğaltılması beklenmektedir. Ancak bu bantların büyüklüklerinin birbirlerine yakın olmasından dolayı bu bantların agaroz jel elektroforez yöntemiyle ayrıştırılması mümkün değildir. Bu nedenle sw-5 lokusuna sahip genlerin hepsinin agaroz jelinde yaklaşık 300 bp uzunluğunda bir bant çoğaltılması beklenmektedir. Bu bantların aralarındaki farkların görülmesi mümkün değildir. Bu çalışmada Sw5-a-e primerleriyle yapılan PCR sonucunda elde edilen ürünler 100 bp plus DNA büyüklük markörüyle birlikte %1.5'luk agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırıldıktan sonra görüntülenerek yaklaşık 300 bp uzunluğundaki DNA bantlarının çoğaltılıp çoğaltılmadığı belirlenmiştir. Yapılan PCR ve elektroforez çalışmaları sonucundan analiz edilen tüm domates çeşitlerinin bazılarında ve pozitif kontrol bitkilerinin genomik DNA'larından 300 bp büyüklüğünde Sw5-a-e markörüne spesifik bir DNA çoğaltılırken negatif kontrol bitkisinden ve hiçbir genomik DNA içermeyen ve sadece su kontrolünden ve bazı domates örneklerinden herhangi bir DNA çoğaltılamamıştır. Sw-5 lokusuyla bağlantılı Sw5-a-e markörüne spesifik primerlerle yapılan PCR sonucunda elde edilen PCR ürünleri Şekil 4.4.'de gösterilmektedir.

Yapılan analizler sonucunda kullanılan örneklerin 65 tanesinden (1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 71) yaklaşık 300 bp büyüklüğünde Sw5a-e markörüne spesifik bir DNA parçası çoğaltılmıştır. Çoğaltılan bantların yoğunlukları örnekler arasında farklılıklar gösterse de 300 bp uzunluğundaki Sw5-a-e markörüne spesifik bant yukarıda belirtilen 65 örneğin tamamında açıkça görülmekte olup bu sonuçlar örneklerin sw-5 lokusunu taşıdıklarını göstermektedir. Buna karşın test edilen 6 domates örneğinden (4, 15, 28, 46, 60, 70 nolu örnekler) hiç bir DNA bandı

çoğaltılamamıştır. Bu örneklerin genomik DNA'ları incelendiğinde yeterli miktarda genomik DNA içerdiği (Şekil 4.1) ve 70 nolu örnek haricindeki tüm örneklerden 18S rRNA geninin çoğaltıldığı (Şekil 4.2) görülmektedir. Bu nedenle bu örneklerden PCR'a uygun genomik DNA izole edilmesine rağmen bunların sw-5a-e markörüne spesifik 300 bp'lik bandı yani sw-5 lokusunu içermediklerini bulunmuştur. Bu sonuçlar test edilen 71 domates çeşidinden 65 tanesinin sw-5 lokusunu taşıdıklarını gösterirken 6 örnekte herhangi bir bant çoğaltılmamış olup bunların Sw5-a-e markörünü taşımadığı ve bu nedenle TSWV' ne dayanıklı olmadıkları belirlenmiştir.

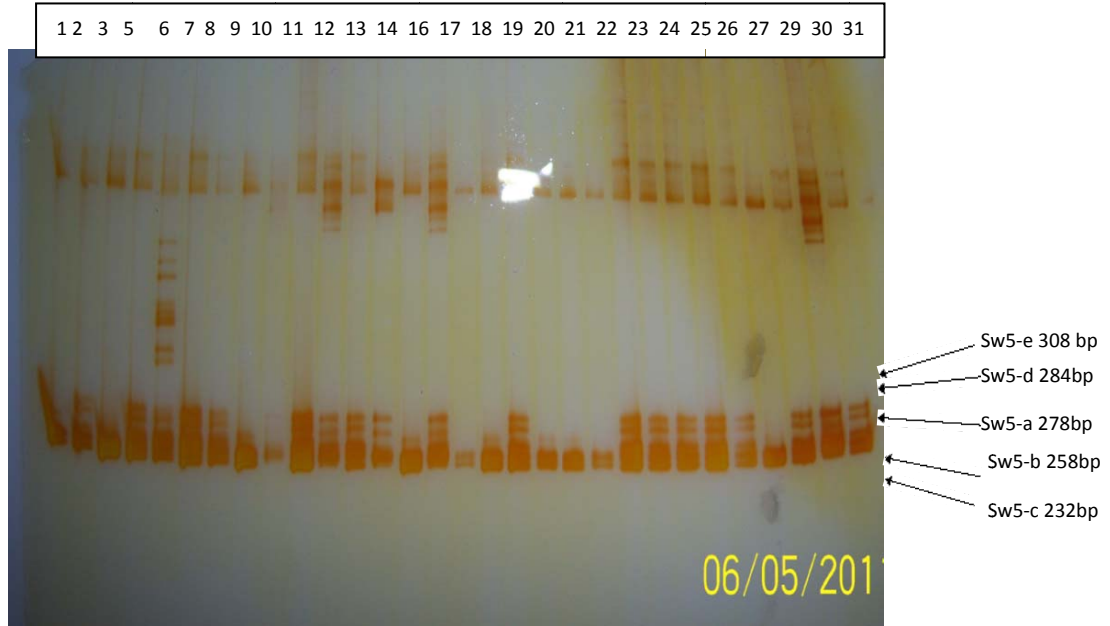


Şekil 4.5. Sw-5a-e markörüne spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR sonuçlarının jel görüntüsü M: 100 bp plus DNA büyüklük markörü, Su: s negatif kontrol olarak kullanılan ve DNA içermeyen su kontrolünü, -: negatif kontrol olarak kullanılan sw-5 lokusu içermeyen domates çeşidini +:pozitif kontrol olarak kullanılan ve sw-5 lokusu içerdiği bilinen domates çeşidini 1-71 arasındaki sayılar: Çizelge 3.1de gösterilen domates çeşitlerini göstermektedir.

4.6. Sw-5 Lokusunda Bulunan Genlerin Belirlenmesi

TSWV dayanıklılığı sağlayan sw-5 geniyle bağlantılı olan markörlerden daha önce rapor edilen CT220 lokusu spesifik bir markör olup bitkilerde sw-5 lokusunun bulunup bulunmadığını göstermektedir. Sw-5-2 markörü ise sw-5 lokusunda bulunan genlerden TSWV'ne dayanıklılık sağlayan sw-5b geninin promotör bölgesini de kapsamaktadır. Bu çalışmada daha önce rapor edilen sadece lokus spesifik markörden ve sw-5 geninin protein kodlamayan bölgesini içeren markörden farklı bir markör geliştirmek de amaçlanmıştır. Bu nedenle bu çalışmada sw-5 lokusunda bulunan 5 farklı sw-5 geninin ayrılması amacıyla gen bankası veri tabanında bulunan Sw-5a, Sw-5b, Sw-5c, Sw-5d, Sw-5e genleri karşılaştırılarak tüm Sw-5 genlerinin korunmuş ancak hepsinden farklı büyüklükte DNA parçaları çoğaltılan bir çift primer tasarlanarak Sw-5 lokusunu taşıyan çeşitlerin hangi Sw-5 genini taşıdıklarını ortaya koyacak bir markör geliştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan 71 domates bitkisinden elde edilen genomik DNA'ların tamamına Sw5a-e markörüne spesifik primerler kullanılarak PCR yapılmıştır. Bu primerler kullanılarak sw-5 lokusunda bulunan sw-5a sw-5b sw-5c, sw-5d ve sw-5e genler için sırasıyla, 278 bp, 258 bp, 232 bp, 284 bp ve 308 bp büyüklüğünde bantlar çoğaltılması beklenmektedir. PCR ürünleri yukarıda belirtildiği gibi agaroz jelinde ayrıştırılınca yaklaşık 300 bp uzunluğunda sw-5 lokusuna spesifik bir bant üreterek test edilen bitkilerde lokusun varlığının belirlenmesi amacıyla kullanılabilir. Ancak aynı PCR ürünlerinin çözünürlüğü daha yüksek olan poliakrilamid jelinde ayrıştırılmasıyla 278 bp, 258 bp, 232 bp, 284 bp ve 308 bp büyüklüğünde ve sırasıyla sw-5a, sw-5b, sw-5c, sw-5d ve sw-5e genlerine denk gelen bantlar biri birinden kolaylıkla ayılarak her bir bitkinin sw-5 lokusunda hangi sw-5 genlerini bulduklarını belirlenebilmektedir. Bu amaçla Sw5-2 a-e primerleriyle teste edilerek sw-5 lokusunu taşıdığı belirlenen 63 domates çeşidinden tekrar yapılan PCR sonucunda elde edilen ürünler 100-500 bp uzunluğundaki bantlar içeren DNA büyüklük markörüyle birlikte 10%'luk poliakrilamid jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırıldıktan sonra gümüş nitratla boyanarak çoğaltılan bantlar görüntülenmiştir. Elde edilen jel görüntüleri analiz edilerek 278 bp, 258 bp, 232 bp, 284 bp ve 308 bp büyüklüğünde ve sırasıyla sw-5a sw-5b sw-5c, sw-5d ve sw-5e genlerine denk gelen bantların varlığı belirlenerek bu

çalışmada kullanılan ve sw-5 lokusunu taşıdığı bir önceki kısımda ortaya konan domates çeşitlerinin sw-5 lokusunda hangi sw-5 genini içerdikleri bulunmuştur. Bazı domates çeşitlerinden Sw5-a-e primerleriyle çoğaltılan PCR ürünlerinin poliakrilamid jelinde elektroforez analizlerinden elde edilen görüntü Şekil 4.5’de verilmektedir. Yapılan poliakrilamid jel elektroforez çalışmaları sonucunda analiz edilen 63 domates çeşidinin tümünden ve pozitif kontrol bitkilerinin genomik DNA’larından 258 bp büyüklüğünde TSWV’ne dayanıklılık sağlayan Sw-5b genine ve diğer sw-5 genlerine spesifik DNA bantları çoğaltılırken negatif kontrol bitkisinden ve hiçbir genomik DNA içermeyen ve sadece su kontrolünden DNA bantları çoğaltılamamıştır. Elde edilen jel görüntüleri analiz edilerek her bir çeşidin sw-5 lokusunda bulunan Sw-5a sw-5b sw-5c, sw-5d ve sw-5e genlerinden hangilerini içerdiği belirlenerek Çizelge 4-1’de ayrıntılı olarak verilmiştir. Buna göre kullanılan domates çeşitleri sw-5 lokusunu oluşturan tüm genler bakımından incelendiğinde test edilen 63 domates çeşidinden sadece 28 tanesinin lokusta bulunan sw-5a sw-5b sw-5c, sw-5d ve sw-5e genlerinin tamamını içerdiği belirlenirken geriye kalan 35 domates çeşidinin ise bu genlerden 2-4 tanesini içerdiği tespit edilmiştir. Poliakrilamid jelinde analiz edilen 63 domates çeşidinin de sw-5a sw-5b sw-5c, sw-5d ve sw-5e genlerini taşıyan çeşitlerin sayısı sırasıyla 49, 63, 56, 33 ve 37 olmuştur. Buna göre domates çeşitlerinin sw-5 lokusunda en çok bulunan gen 63 ile sw-5b olurken en az bulunan gen ise sadece 33 çeşitte belirlenen sw-5d geni olmuştur. Elde edilen bulgular sw-5 lokusunu içeren tüm domates çeşitlerinin TSWV’ne dayanıklılık sağlayan sw-5b genini içerdiğini göstermiştir.



Şekil 4.6. Sw5-a-e primerleriyle çoğaltılan PCR ürünlerinin poliakrilamid jel elektroforezi ayrıştırılması sonucunda Sw-5 lokusunda bulunan genleri gösteren jel fotoğrafı

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan tüm domates çeşitlerinin sw-5 dayanıklılık markörlerini bulundurma durumları

Çeşit No	Sw-a	Sw-b	Sw-c	Sw-d	Sw-e
1	+	+	+	-	-
2	+	+	+	+	+
3	-	+	+	-	-
5	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+
9	-	+	+	-	-
10	-	+	-	-	-
11	+	+	+	+	+
12	+	+	-	+	-
13	+	+	-	+	+
14	+	+	-	+	-
16	-	+	+	-	-
17	-	+	-	+	-
18	-	+	+	-	-
19	-	+	+	-	-

20	+	+	+	+	+
21	-	+	+	-	-
22	-	+	+	-	-
23	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+
26	+	+	+	+	+
27	+	+	+	+	+
29	+	+	+	-	-
30	+	+	+	+	+
31	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+
33	+	+	+	+	+
34	+	+	+	+	+
35	+	+	+	+	+
36	+	+	+	-	-
37	+	+	+	-	-
38	+	+	+	+	+
39	+	+	+	-	-
40	+	+	+	-	+
41	+	+	+	-	-
42	+	+	+	+	+
43	+	+	-	-	+
45	+	+	+	-	-
47	+	+	+	+	+
48	+	+	+	-	-
49	+	+	+	-	+
50	+	+	+	-	+
52	-	+	+	-	-
53	-	+	+	-	-
54	-	+	+	-	-
55	-	+	+	-	-
56	-	+	+	-	-
57	+	+	+	+	+
58	+	+	+	+	+
59	+	+	+	-	+
61	+	+	+	+	+

62	+	+	+	+	+
63	+	+	+	+	+
64	+	+	+	-	+
65	+	+	+	-	+
66	+	+	-	+	+
67	+	+	+	-	-
68	+	+	+	+	+
69	+	+	+	+	+
71	+	+	+	-	-

4.7. Domates Çeşitlerinin Dayanıklılık Markörlerine Göre Skorlanması

Bu çalışmada kullanılan farklı markör türlerinden elde edilen bulgular değerlendirilerek çalışmada kullanılan her bir domates çeşidinin markörleri taşıyıp taşımadıklarına göre skorlanması yapılmıştır. Bu amaçla farklı primerlerle yapılan PCR sonuçları her bir örnek için incelenmiş ve her bir marköre spesifik DNA bandı çoğaltılmış ise 1 çoğaltılmamış ise 0 olarak skorlanmıştır. Bu skorlama her bir markör için kullanılan tüm domates çeşitlerine yapılarak çeşitlerin bir birleriyle karşılaştırılması sağlanmıştır. Yapılan dayanıklılık markörü skorlamaları Çizelge 4.3'de verilmiştir. Test edilen çeşitlerde skorlanan markörlerin bulunma durumlarına göre çeşidin dayanıklı veya dayanıksız olabileceği de bildirilmiştir. PCR testleriyle taranan 3 markörden en az ikisini taşıyan domates çeşitlerinin dayanıklı olabileceği taranan markörlerin hiçbirini veya sadece birini taşıyanlarının ise dayanıklı olmadıkları belirtilmiştir. Buna göre test edilen toplam 71 domates çeşidinden 12 tanesi çalışmada taranan CT220, sw-5-2 ve sw-5a-e markörlerinin her üçünü de içerdiği belirlenirken geriye kalan 59 tane çeşit ise bu markörlerden hiçbirini veya sadece bir ya da bir kaç tanesini taşıdığı belirlenmiştir. Bu domates çeşitlerinden 4 tanesi (4, 15, 60, 70) taranan markörlerden hiçbirini içermezken 2 (28 ve 46) tanesi sadece CT220'yi geriye kalan 65 tanesi de sadece Sw-5-2 ve Sw-5a-e markörlerini içerdiği belirlenmiştir. Elde edilen bulgular bu çalışmada kullanılan 6 çeşidin sw-5 lokusuyla bağlantılı markörleri içermediği ve TSWV'ne duyarlı olabileceğini, geriye kalan 65 çeşidin ise taranan üç markörden en az ikisini taşıyarak sw-5 lokusuna sahip ve TSWV'ne dayanıklı olabileceğini ortaya koymuştur.

Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan tüm domates çeşitlerinin sw-5 dayanıklılık markörlerini bulundurma durumları

FİRMA	Çeşit numarası	TSWV'e dayanıklılık	MSC sonuçları	CT220 sonuçları	Sw-5-2 sonuçları	Sw5-a-e sonuçları	Skorlama
A Tohumculuk	1	Bilinmiyor	1	1	0	1	Dayanıklı
	2	Bilinmiyor	1	0	0	1	Duyarlı
	3	Bilinmiyor	1	1	0	1	Dayanıklı
	4	Bilinmiyor	1	0	0	0	Duyarlı
	5	Bilinmiyor	1	1	0	1	Dayanıklı
	6	Bilinmiyor	1	1	0	1	Dayanıklı
	7	Bilinmiyor	1	1	0	1	Dayanıklı
	8	Bilinmiyor	1	1	0	1	Dayanıklı
	9	Bilinmiyor	1	1	0	1	Dayanıklı
	10	Bilinmiyor	1	0	1	1	Dayanıklı
	11	Bilinmiyor	1	1	0	1	Dayanıklı
B Tohumculuk	12	Dayanıklı	1	1	1	1	Dayanıklı
	13	Duyarlı	1	0	0	1	Duyarlı
	14	Dayanıklı	1	1	1	1	Dayanıklı
	15	Duyarlı	1	0	0	0	Duyarlı
	16	Duyarlı	1	0	0	1	Duyarlı
	17	Dayanıklı	1	0	1	1	Duyarlı
	18	Duyarlı	1	0	0	1	Duyarlı
	19	Bilinmiyor	1	1	0	1	Dayanıklı
	20	Duyarlı	1	1	0	1	Dayanıklı
C Tohumculuk	21	Duyarlı	1	1	0	1	Dayanıklı
	22	Duyarlı	1	1	0	1	Dayanıklı
	23	Duyarlı	1	0	0	1	Duyarlı
	24	Duyarlı	1	1	0	1	Dayanıklı
D Tohumculuk	25	Bilinmiyor	1	1	0	1	Dayanıklı
	26	Duyarlı	1	1	0	1	Dayanıklı
	27	Duyarlı	1	1	0	1	Dayanıklı
	28	Duyarlı	1	1	0	0	Duyarlı
	29	Duyarlı	1	1	0	1	Dayanıklı
	30	Duyarlı	1	1	0	1	Dayanıklı
	31	Duyarlı	1	1	0	1	Dayanıklı
	32	Dayanıklı	1	1	1	1	Dayanıklı

	33	Bilinmiyor	1	1	0	1	Dayanıklı
	34	Bilinmiyor	1	1	0	1	Dayanıklı
	35	Duyarlı	1	1	0	1	Dayanıklı
	36	Duyarlı	1	1	0	1	Dayanıklı
	37	Duyarlı	1	1	0	1	Dayanıklı
	38	Duyarlı	1	1	0	1	Dayanıklı
	39	Bilinmiyor	1	1	0	1	Dayanıklı
	40	Duyarlı	1	1	0	1	Dayanıklı
	41	Dayanıklı	1	1	1	1	Dayanıklı
	42	Duyarlı	1	1	0	1	Dayanıklı
	43	Duyarlı	1	1	0	1	Dayanıklı
E Tohumculuk	44	Bilinmiyor	1	1	0	1	Dayanıklı
	45	Dayanıklı	1	0	0	1	Duyarlı
	46	Duyarlı	1	1	0	0	Duyarlı
	47	Duyarlı	1	1	1	1	Dayanıklı
	48	Duyarlı	1	1	0	1	Dayanıklı
	49	Duyarlı	1	1	0	1	Dayanıklı
	50	Duyarlı	1	1	1	1	Dayanıklı
	51	Duyarlı	1	1	0	1	Dayanıklı
F Tohumculuk	52	Duyarlı	1	1	0	1	Dayanıklı
	53	Duyarlı	1	1	0	1	Dayanıklı
	54	Duyarlı	1	1	0	1	Dayanıklı
	55	Duyarlı	1	1	0	1	Dayanıklı
	56	Duyarlı	1	1	0	1	Dayanıklı
	57	Duyarlı	1	1	0	1	Dayanıklı
G Tohumculuk	58	Dayanıklı	1	1	0	1	Dayanıklı
	59	Dayanıklı	1	1	0	1	Dayanıklı
	60	Dayanıklı	1	0	0	0	Duyarlı
	61	Dayanıklı	1	1	1	1	Dayanıklı
	62	Dayanıklı	1	1	1	1	Dayanıklı
	63	Dayanıklı	1	1	1	1	Dayanıklı
	64	Dayanıklı	1	1	1	1	Dayanıklı
	65	Dayanıklı	1	1	1	1	Dayanıklı
	66	Dayanıklı	1	1	1	1	Dayanıklı
	67	Dayanıklı	1	1	0	1	Dayanıklı
	68	Dayanıklı	1	0	1	1	Dayanıklı

	69	Bilinmiyor	1	1	0	1	Dayanıklı
	70	Duyarlı	0	0	0	0	Duyarlı
	71	Duyarlı	1	1	0	1	Dayanıklı

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yapılan bu çalışmada dünyada ve ülkemizde domates yetiştirilen alanlarda önemli ekonomik kayıplara neden olan domates lekeli solgunluk virüsüne (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) karşı dayanıklılık sağlayan sw-5 geninin 71 farklı çeşitte var olup olmadığını bu gene bağlantılı üç farklı markörün CT220, Sw-5-2 ve Sw5-a-e kullanılmasıyla belirlenmiştir. Bu amaçla kullanılan markörlerden ikisi CT220 ve Sw-5-2 daha önce geliştirilerek sw-5 geniyle bağlantısı gösterilmiştir. Üçüncü markör olan Sw5-a-e ise bu çalışmada geliştirilmiştir. Çalışmada kullanılan markörler farklı tiplerde markörler olup sw-5 geniyle bağlantıları bakımından da farklılık göstermektedir.

CT220 markörü ilk olarak sw-5 lokusuyla bağlantılı bir RFLP markörü olarak belirlendikten (Stevens ve ark 1994) sonra DNA dizilimi belirlenerek bu diziyeye spesifik primerler tasarlanmak suretiyle CAPS markörüne dönüştürülerek (Folkertsma ve ark., 1999) sw-5 lokusunu taramada ve MAS çalışmalarında başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Folkertsma ve ark., 1999; Garland et al., 2005). sw-5 geninin homoloğu olan sw5-c, d, e genleri ile ilişkili olduğu bilinen CT220 markörüyle Spassova (2001), daha önce yapılan bir çalışmada Sw-5-LRR ve CT220-ZUP primerleri bir arada kullanılarak 50 domates çeşidi test edilmiştir ve sonuç olarak bunlardan 34 tanesi 200 bp dayanıklılık bandını içerirken 16 tanesinin 100 bp duyarlılık bandını içerdiği tespit edilmiştir (Garland et al., 2005). Bu çalışmada CT220 primerleriyle yapılan tarama sonucunda 46 domates çeşidinde 200 bp büyüklüğündeki dayanıklılık bandı belirlenirken 25 tane çeşitten bu bant elde edilememiştir. CT220 CAPS markörüne dönüştürülmesiyle çoğaltılan PCR ürünleri *Mse* I, veya *Ase* I restriksiyon enzimlerinden biriyle kesilerek sw-5 lokusunun genotipinde homozigot veya heterozigot olduğu da belirlenebilmektedir (Folkertsma ve ark., 1999; Garland et al., 2005). Daha önce yapılan bir çalışmada çeşitlerin Sw-5 bakımından heterozigot dayanıklı veya homozigot duyarlı oldukları da belirlenmiştir. Ancak bu çalışmada restriksiyon enzimleriyle kesim yapılarak heterozigot veya homozigot ayrımı yapılmamıştır. Buna karşın bu çalışmada test edilen domates çeşitlerinden 9 tanesinde (8, 19, 26, 31, 41, 43, 45, 46 ve 47) CT220 markörüyle ilişkili olmayan 300 bp büyüklüğünde bir bant çoğaltılmıştır. Bu bant

uygulanan PCR koşullarından veya kullanılan PCR cihazındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği gibi sw-5 lokusunda ki farklılıklardan da kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu daha önce yapılan çalışmalarda bulunmadığından ve sw-5 lokusuyla ilişkilendirilmediğinden dolayı bu çeşitlerin dayanıklılık geni içermedikleri düşünülmüştür.

Sw-5-2 markörü CT220'den farklı olarak lokusla bağlantılı değil lokusa spesifik bir SCAR markörü olup eş-baskın (co-dominant) özellik göstermektedir. Bu markörün rapor edildiği bir çalışmada bu marköre spesifik primer setiyle sw-5 lokusuna sahip yani dayanıklı bitkilerden 574 bp büyüklüğünde bant üretirken sw-5 lokusu taşımayanlarda ise yaklaşık 510 bp veya 464 bp uzunluğunda bir DNA bandının çoğaltıldığı belirlenmiştir. Bu nedenle bu şekilde test edilen bitkilerin Sw-5 genini taşıyıp taşımadığı ve taşıyanların ise sw-5 geni bakımından homozigot veya heterozigot oldukları da belirlenebilmektedir. Sw5-2 markörüyle daha önce 14 domates çeşidi kullanılarak yapılan bir çalışmada 4 çeşit (Stevens, Viradoro, *S. peruvianum* 'PI 128660', Santa Clara R') 574 bp büyüklüğünde bant içererek dayanıklı bulunurken, 2 çeşit (Nemo Netta, ve Ohio 8245) 510 bp büyüklüğünde DNA bandı içererek ve 8 çeşit, ise (Santa Clara S', Ponderosa, IPA-5, Densus, Moneymaker, CNPH Tx-577, Alambra, ve Netta) 464 bp uzunluğunda bir bant içererek duyarlı olarak bulunmuştur (Dianese et al., 2010). Sw-5-2 markörüne spesifik primerler kullanılarak bu çalışmada yapılan PCR sonucunda sadece bir (68.) çeşitte 574 bp büyüklüğünde bir bant çoğaltılarak homozigot dayanıklı bulunurken 14 domates çeşidinin (14 10, 12,14, 17, 32, 41, 47, 50, 61, 62, 63, 64, 65 ve 66) 464 bp ve 574 bp büyüklüğünde bantların her ikisini de içererek heterozigot dayanıklı olarak bulunmuştur. Geriye kalan örneklerin 8 tanesinden (4, 15, 44, 45, 46, 51, 60, 70) herhangi bir bant çoğaltılmadığından ve 48 çeşitten de sadece 510 veya 464 bp büyüklüğünde bant elde edildiğinden bu çeşitlerin Sw-5 geni içermedikleri yani duyarlı oldukları belirlenmiştir.

Elde edilen bulgular Sw-5-2 markörünün daha spesifik bir markör olduğunu ve bu marköre spesifik primerlerle çoğaltılan DNA'ların dizilimlerinin belirlenip analizleri yapıldığında çoğaltılan Sw-5 lokusuna spesifik olduğunu çoğaltılan DNA'lar

arasındaki büyüklük farkların baz ekleme ve çıkarmalardan kaynaklandığını göstermiştir. Dayanıklı ve dayanıksız çeşitlerin ayrımını gösteren primerlerle çoğaltılan bölgenin fonksiyonel sw-5b geninin promotör bölgesinin -31 pozisyonundan genin içine kadar uzandığı belirlenmiştir (Dianese et al., 2010). Bu da Sw-5-2 markörünün doğrudan Sw-5b genine spesifik olduğunu göstermekte olup lokusla bağlantılı bulunan CT220 marköründen daha etkili biçimde TSWV' ne dayanıklılığını belirlemektedir. Bu çalışmada her iki markörle alınan sonuçların kıyaslanması test edilen örneklerden çoğunun (45 tanesi) CT220 ile Sw-5 lokusunu taşıdığı belirlenirken Sw-5-2 markörüyle sw-5 genini içeren domates çeşitlerinin sayısı sadece 15 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar bu markörün daha spesifik ve seçici olduğunu göstermekte olup Sw-5 lokusuyla değil sadece sw-5b geniyle spesifik olmasından dolayı sadece Sw-5 b geni taşıyan bitkileri belirlemektedir. Bu çalışmada kullanılan örneklerden sağlayıcı firma tarafından dayanıklı olduğu belirtilen 45 ve 60 numaralı örneklerinden Sw-5-2 primerleriyle yapılan PCR sonucunda dayanıklılıkla ilişkili bantlar elde edilememiştir. Duyarlı olduğu tespit edilen 60 numaralı çeşidin diğer markörlerle yapılan taramalar sonucunda duyarlı olduğu fakat firma tarafından duyarlı olduğu belirtilen (20, 21, 22, 24, 26, 27, 29, 30, 31, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 44, 48, 49, 49, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 71) numaralı çeşitlerin Sw-5-2 ile duyarlı bulunurken çeşidin diğer markörlerle yapılan taramalar sonucunda Sw-5 lokusunu içermesi sonucunda dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. Farklı markörlerle farklı sonuçların alınması PCR yönteminin uygulamasındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği gibi büyük olasılıkla markörlerin farklı özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

TSWV dayanıklılığı sağlayan sw-5 geniyle bağlantılı olduğu daha önce rapor edilen ve bu çalışmada kullanılan markörlerden CT220 lokus spesifik bir markör olup bitkilerde sw-5 lokusunun bulunup bulunmadığını göstermektedir. Ancak Sw-5-2 lokusunun farklı genler içerdiği belirlenerek Sw-5b geninin dayanıklılık için gerekli olduğu ancak lokusta bulunan diğer 4 genin de dayanıklılığa katkı sağladıkları öne sürülmüştür (Spasova et al., 2011). Çalışmada kullanılan markörlerden Sw-5-2 markörü ise Sw-5 lokusunda bulunan genlerden TSWV'ne dayanıklılık sağlayan Sw-5b geninin promotör bölgesini de kapsamakta olup sadece Sw-5b genine spesifiktir

(Dianese et al., 2010). Bu nedenle bu markörde Sw-5 lokusunda bulunan genlerden sadece birinin varlığını belirtmektedir. Bu çalışmada daha önce rapor edilen sadece lokusa spesifik markörden ve Sw-5 geninin protein kodlamayan bölgesini içeren gen spesifik markörden farklı ve hem lokusun ve lokusta bulunan genlerin varlığını belirleyen bir markör geliştirilmiştir. Diğerlerinden farklı bant çoğaltılmıştır. Bu bantlar arasındaki farklılıklar agaroz jelinde görünmezken poliakrilamid jelinde kolayca ayrılabilir. Böylece aynı PCR ürünü agaroz jelinde analiz edilerek lokusun Sw-5 lokusunun varlığı belirlenirken poliakrilamid jelinde ise lokusta hangi genlerin bulunduğu ortaya konmaktadır. Yapılan analizler sonucunda bu marköre spesifik primerlerle Sw-5 lokusunda bulunan Sw-5a, Sw-5b, Sw-5c, Sw-5d ve Sw-5e genlerinin her birine spesifik bantlar karşılaştırılarak tüm Sw-5 genlerinde korunmuş ancak hepsinden farklı büyüklükte DNA parçaları çoğaltılan bir çift primer tasarlanarak Sw-5 lokusunu taşıyan çeşitlerin hangi Sw-5 genini taşıdıklarını ortaya koyacak bir markör geliştirilmiştir. Sw-5-a-e primerleriyle yapılan PCR sonucunda 6 çeşidin Sw-5 lokusunu taşımadığı ve TSWV duyarlı olduğu olabileceği belirlenirken bunun dışındaki diğer 65 çeşidinde Sw-5 lokusuna sahip olduğu ve TSWV'e dayanıklı olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan markörlerin üçünden alınan sonuçların kıyaslanmasıyla en fazla sayıda Sw-5 lokusuna sahip domates çeşidi bu çalışmada geliştirilen Sw-5a-e markörüyle belirlenmiştir. Sw-5 a-e markörüyle 65 bitkide Sw-5 lokusu bulunurken CT220 markörüyle 45 çeşitte ev Sw-5-2 markörüyle ise sadece 15 bitkide Sw-5 dayanıklılığının bulunduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar markörün bulunma sıklığının taranan markörün lokusa veya gene spesifik olmasıyla ilişkili olduğu markörün spesifikliği arttıkça pozitif örnek sayısının azaldığı belirlenmiştir. Bu nedenle sadece bir markör değil birkaç markörle yapılan taramalar sonucundan daha sağlıklı sonuçlar alınabileceği gösterilmiştir. Bu nedenle bu çalışmada kullanılan üç markörden en az ikisiyle Sw-5 lokusunun taşıdığı belirlenen çeşitlerin TSWV'ne dayanıklı olabileceği ancak her üç markörle pozitif sonuç verenlerin ise TSWV'ne karşı dayanıklı olma olasılıklarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Buna göre yapılacak taramalarda hem lokus hem gen spesifik markörlerin kullanılması önerilmektedir.

Sw-5 lokusunun TSWV'ne karşı dayanıklılık sağlandığı ve dayanıklılıkta en etkili genin Sw-5b olduğu da daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Buna ek olarak Sw-5 lokusunda bulunan diğer genleri oluşturulan Sw a, c, d ve e genlerinin de domateste tospovirüslere karşı dayanıklılıkta etki ve katkılarının da olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle markör yardımıyla dayanıklı çeşitlerin belirlenmesi çalışmalarında sadece lokusun varlığını değil lokusun içerdiği genleri de belirleyen bir markörün kullanılması çeşitlerin dayanıklılık durumlarının daha iyi bir şekilde belirlenmesine yardımcı olacaktır. Bu bağlamda bu çalışmada geliştirilen Sw-5a-e genlerinin varlığının belirlenmesinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Çalışmada test edilen ve Sw-5 lokusunu taşıdığı belirlenen Sw-5 a-e markörünün poliakrilamid jelde analizi yapılarak kullanılan domates çeşitlerinin sw-5 lokusunu oluşturan tüm genler bakımından incelenmesi yapıldığında test edilen 62 domates çeşidinden sadece 28 tanesinin lokusta bulunan sw-5a, sw-5b, sw-5c, sw-5d ve sw-5e genlerinin tamamını içerdiği ve en fazla dayanımı gösterecek çeşitler olduğu belirlenmiştir. Geriye kalan 34 domates çeşidinin ise bu genlerden 2-4 tanesini içerdiği tespit edilmiş olup sw-5a sw-5b sw-5c, sw-5d ve sw-5e genlerini taşıyan çeşitlerin sayısı sırasıyla 48, 62, 55, 33 ve 37 olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar test edilen ticari domates çeşitlerinin birçoğuna tospovirüslere dayanıklılık (sw-5) geninin aktarıldığını göstermektedir. Ancak çeşitlerin virüse karşı tepkileri deneysel olarak belirlenmediğinden dayanıklılık genlerinin fonksiyonel olup olmadığı bilinmemektedir. Domates çeşitlerinin Sw-5 lokusunu taşımaları dayanıklı olabileceklerini gösterirken genlerde meydana gelebilecek mutasyon ve değişiklikler bitkide Sw-5 geni olsa bile genin ifade edilip edilmediğine veya ifade edilme zamanı ve miktarına göre değişebilmektedir. Bu nedenle bu bitkilerinin dayanıklılıklarının inokülasyon çalışmalarıyla patojenite testi yapılarak dayanıklılık teyit edilmelidir. Ancak çok sayıda bitkinin hızlı ve güvenilir bir şekilde taranması ve çok sayıda bireyin üretildiği melezleme çalışmalarında geni ve lokusu taşıyan bireylerin belirlenmesi amacıyla markörlerin kullanımı fayda sağlamakta ve biyolojik dayanıklılık testlerinin yapılacağı örnek sayısının en aza indirilmesine yardımcı olarak ıslah süresini önemli ölçüde kısaltmaktadır.

Bitkilerde dayanıklılığın yaygınlaştırılması dayanıklılık genlerinin bulunabilirliğine ve ticari açıdan önemli çeşitlere aktarılmasına bağlıdır. Markör yardımıyla seleksiyon yöntemi kullanılarak tahıl, sebze ve meyvede birçok hastalığa karşı dayanıklılık geliştirme süreci önemli ölçüde kısaltılarak dayanıklılık geliştirilmiştir. Domates lekeli solgunluk virüsüne dayanıklılık sağlayan Sw-5 geni ilk olarak Stevens çeşidine aktarıldıktan sonra yaygın olarak yetiştirilen çeşitlere de aktararak birçok domates çeşidinde dayanıklılık geliştirilmiştir. Sw-5 geni halen ıslahçılar tarafından dayanıklılık geliştirmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun en önemli nedenlerinden birisi dayanıklılığın genetik olarak belirlenmesine yardımcı olan markörlerin varlığı ve kullanılabilirliğidir.

Sonuç olarak ülkemizde ekonomik öneme sahip ihracatta da birinci sırada yer alan domateste en tahrip edici virüs olan TSWV'ne karşı dayanıklılık geliştirmede markör destekli seleksiyon yöntemlerinden yararlanma olanakları yaygınlaştırılmalıdır. Ayrıca markör destekli seleksiyonda kullanılacak dayanıklılık özelliğiyle ilişkili farklı özellik ve spesifiklikte yeni markörlerin geliştirilmesi desteklenmelidir. Virüsün konukçu sınırı geniş olduğundan dolayı birçok bitkide hastalığa yol açmaktadır. Bu nedenle domateste geliştirilecek markörler diğer konukçu bitkilerde Sw-5 lokusunun belirlenmesinde de kullanılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Adkins, S., Zitter, T., and Momol T., 2005. Tospoviruses (Family Bunyaviridae, Genus Tospovirus). PP-212, One of a Series of The Plant Pathology Department , Florida Cooperative Extension Services Institute of Food And Agricultural Sciences, University of Florida.
- Ağaoğlu, Y.S. ve Ergül, A., 1999. Amasya Üzüm Çeşidi Ekotiplerinin RAPD Markörleri ile Genetik Tanımlanmaları. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kong., Cilt 2, 369-372.
- Anonim, 2006. Ziraî Mücadele Teknik Talimatı, Domates Lekeli Solgunluk Virüsü, S:1-2.
- Anonim, 2009. Akdeniz ihracatçı Birlikleri Araştırma serisi 59- 01.06.2009.
- Anonim, 2010. Tarımsal Üretim Verileri. <http://apps.fao.org>. Erişim tarihi: 12.01.2010.
- Anonim, 2011a. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Domates> Erişim tarihi:06.06.2011 17:15
- Anonim, 2011b. <http://www.batem.gov.tr/urunler/sebzelerimiz/domates/domates.htm> erişim tarihi:05.09.11 20:34
- Anonymous, 1998. CABI/EPPO Tomato spotted wilt tospovirus. *Distribution Maps of Quarantine Pests for Europe* no. 342. CAB International, Wallingford.
- Azeri, T., 1981. Preliminary Report of Tomato Spotted Wilt Virüs and its Epidemy on Tobacco in the Çanakkale Region of Turkey. J Turkish Phytopathology, 10(2-3): 79- 87.
- Azeri, T., 1994. Detection of Tomato Spotted Wilt Virüs in Tabacco and Tomato Cultivars by Enzyme Linked İmmunosorbent Assay. J. Turkish Phytopathology, 23(1): 37- 46.
- Bozdoğan, V., 2009. Antalya İlinde Domates, Biber ve Marul Yetiştirilen Alanlarda Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (Tomato Spotted Wilt Virus, TSWV)' nün Saptanması Çukurova Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi, s.75, Adana.
- Brommonschenkel, S.H., Frary, A., Frary, A. and Tanksley, S.D. 2000. The broad-spectrum tospovirus resistance gene *Sw-5* of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene *Mi*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 13: 1130–1138.

- Budak H., Bölek Y., Dokuyucu T., Akkaya A., 2004. Bitki Islahında Moleküler Markörlerin Kullanımı KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi 7(1)
- Colariccio, A., Eiras, M., Chaves, A.L.R., Harakava, R., Chagas, C.M., 2004 *Tomato chlorotic spot virus* in hydroponically-grown lettuce in São Paulo State, Brazil Fitopatologia Brasileira 29:307-311.
- Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B., Pang, E.C.K., 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. Euphytica 142: 169–196.
- Değirmenci, K., Uzunoğulları, N., 2007 Marmara Bölgesinde domates yetiştiricilik alanlarında sorun olan virüslerin belirlenmesi. Bitli Koruma Bülteni 47 (1-4):72-77
- Dianese E.C., Fonseca M.E.N., Goldbach R., Kormelink R., Inoue-Nagata A.K., Resende R.O., Boiteux L.S. 2010. Development of a locus-specific, co-dominant SCAR marker for assisted-selection of the Sw-5 (Tospovirus resistance) gene cluster in a wide range of tomato accessions. Mol Breeding, 25:133–142
- Folkertsma R.T., Spassova M.I., Prins M., Stevens M.R., Hille J., Goldbach R.W., 1999. Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library of *Lycopersicon esculentum* cv. *Stevens* and its application to physically map the Sw-5 locus. Mol Breed 5:197–207
- Garland, S., Sharman, M., Persley, D. and McGrath D., 2005. The development of an improved PCR-based marker system for Sw-5, an important TSWV resistance gene of tomato. Australian J. Agric. Research, 56: 285-289.
- Gordillo, L.F., Stevens, M.R., Millard, M.A. and Geary B., 2008. Screening two *Lycopersicon peruvianum* collections for resistance to Tomato Spotted Wilt Virus. Plant Disease, 92(5);694-704.
- Gupta, P., Varshney, R., Sharma, P. and Ramesh, B., 1999. Molecular markers and their applications in wheat breeding, Plant Breed. 118: 369-390.

- Güldür, M.E., Yurtmen M. ve Asil Yılmaz, M., 1995. Mersin ve Çevresinde Yetiştirilen Domateslerde Zararlı Yeni Bir Virüs: Tomato Spotted Wilt Virus. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, s: 8
- Nascimento I.R., Maluf W.R., Figueira A.R., Menezes C.B., Resende J.T.V., Faria M.V., Nogueira D.W., 2009. Marker assisted identification of tospovirus resistant tomato genotypes in segregating progenies. Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.), v.66, n.3, p.298-303
- Jahn M., Paran I., Hoffmann K., Radwanski E.R., Livingstone K.D., Grube R.C., Aftergoot E., Lapidot M., Moyer J. 2000. Genetic mapping of the Tsw locus for resistance to the Tospovirus Tomato spotted wilt virus in *Capsicum spp.* and its relationship to the Sw-5 gene for resistance to the same pathogen in tomato. Mol Plant Microbe Interact.,13(6):673-82.
- Jones, J.B., Stall, R.E., Zitter, T.A., 1991. Compendium of Tomato Diseases. St. Paul, MN: APS Press, 1991, p.16-17.
- Jones, J.P., Jones, J.B., Stall, R.E. and Zitter T.A., 1993. Common Names of Plant Diseases. p.53-55
- Korkmaz, S., Turhan, P., 2006. Çanakkale İlinde Domates Lekeli Solgunluk Virüsünün Serolojik ve Biyolojik Yöntemlerle Saptanması. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi 12 (2):130-136
- Korzun, V., 2002, Use of molecular markers in cereal breeding, Cellular & Molecular Biology Letters 7:811-820.
- Krishna-Kumar, N.K., Ullman, D.E., Cho, J.J., 1993. Evaluation of lycopersicon germ plasm for Tomato spotted wilt tospovirus resistance by mechanical and Trips transmission. Plant Disease 77: 938-941.
- Küçük, B., 2006. Adana ve Mersin illerinde Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (Tomato Spotted Wilt Virus, TSWV)'ün değişik yöntemlerle saptanması. Çukurova Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi, s.83 Adana.
- 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. J. Hort. Sci. & Biotech., 79 (5): 806-810.

- Langride P. ve Chalmers K. 2008. The principle identification and application of molecular markers Molecular marker systems in plant breeding and crop improvement 3-22
- Mound, L.A., 2001. So many thrips – so few tospoviruses. Thrips and Tospoviruses: Proceedings of the 7th International Symposium on Thysanoptera. Reggio Calabria, Italy, p.15-18
- Nascimento I.R., Maluf W.R., Figueira A.R., Menezes C.B., Resende J.T.V., Faria M.V., Nogueira D.W., 2009. Marker assisted identification of tospovirus resistant tomato genotypes in segregating progenies. Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.), 66:298-303.
- Oğuz, A., Ellialtıoğlu, Ş., İlbi, H., Çelik,N., Kabaş, A., Zengin, S., 2010. Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV) Etmenine Dayanıklılık Sağlayan Sw-5 Geninin Moleküler İşaretleyiciler Yardımıyla Belirlenmesi. VIII.Sebze Tarımı Sempozyumu, 23-26 Haziran, Van. Bildiri Kitabı(Eds:Yaşar,F.,Çavuşoğlu,Ş., Biçim,M.), s:464-469.
- Pappu, H.R., A.S. Csinos, R.M. McPherson, Jones D.C., and Stephenson M.G., 2000. Eff ect of acibenzolar-*S*-methyl and imidacloprid on suppression of Tomato spotted wilt *Tospovirus* in fl ue-cured tobacco. Crop Prot. 19:349–354.
- Peterson, D.G., Price, H.J., Johnston, J.S. and Stack, S.M., 1996. DNA content of heterochromatin and euchromatin in tomato (*Lycopersicon esculentum*) pachytene chromosomes. *Genome*, 39: 77–82.
- Pınar, H., Ata, A., Keleş, D., Mutlu, N. ve Benli, N., 2011. Bazı elit domates hatlarının Domates Lekeli Solgunluk Virüsüne Dayanıklılığın Moleküler Markörler Yardımıyla Belirlenmesi. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi, 28-30 Haziran Kahramanmaraş Bildiri Kitabı s:408.
- Samuel, G., Bald, J. G., and Pittman, H.A., 1930. Bull. Count Scient. İnd. Res. Melbourne 44, 65 pp.
- Smiech M., Rusinowski Z., Malepszy S., Niemirowicz-Szczytt K. New RAPD markers of tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance in *Lycopersicon esculentum* Mill. Biotechnology and physiology, 299-302.

- Spasova M.I., Prins T.W., Folkertsma R.T., Klein-Lankhorst R.M., Hille J., Goldbach R.W., Prins M., 2001 The tomato gene SW5 is a member of the coiled coil, nucleotide binding, leucine-rich repeat class of plant resistance gene and confers resistance to TSWV in tobacco. *Mol Breed* 7:151–161
- Stevens M.R., Scott S.J., Gergerieh R.C., 1992. Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica* 59:9-17
- Stumpf, C.F., Kennedy, G.G., 2005. Effects of Tomato spotted wilt virus (TSWV) isolates, host plants, and temperature on survival, size, and development time of *Frankliniella fusca*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 114: 215-225
- Yardımcı, N. ve Çulal Kılıç, H., 2009. Tomato spotted wilt virus in vegetable growing areas in the west mediterranean region of Turkey. *African Journal of Biotechnology* 8 (18), s: 4539-4541
- Yıldırım, H. ve Arlı Sökmen, M., 2011. Sw-5 genini içeren farklı ticari domates çeşitlerinde dayanıklılığı kıran farklı patolojik özellikteki Tomato Spotted Wilt Virus varyantlarının araştırılması. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi, 28-30 Haziran Kahramanmaraş Bildiri Kitabı s:407
- İnternet Sitesi. <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>
Erişim Tarihi: 12.10.2011.
- İnternet Sitesi. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Trips>
Erişim Tarihi: 01.09.2011.
- İnternet sitesi. <http://www.settfest.com/2009/01/pests-and-diseases/>
Erişim Tarihi: 05.09.2010.

ÖZGEÇMİŞ



Adı ve Soyadı : Gülderen KOCA

Doğum Yeri ve Yılı : Alanya, 01.03.1986

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Alanya Ayşe Melahat Erkin Anadolu Lisesi, 2002-2004

Lisans : Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fak. Bitki Koruma Bölümü, Isparta,
2005-2009

Yüksek Lisans: Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma
Anabilim Dalı, Isparta, 2009-2012

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Yayımları (SCI ve diğer makaleler)

1-Çevik B., Bakır T. And Koca G., 2010. First report of Carnation mottle virus in
Turkey. Plant Pathology, (59) 394.