

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**DOMATESTE MOLEKÜLER MARKÖR YARDIMLI SELEKSİYONDA
KULLANILAN BELİRTEÇLERİN GEÇERLİLİĞİNİN KONTROLÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Ceylan Pınar UÇAR
DANIŞMAN: Prof. Dr. Suat ŞENSOY

VAN-2017

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**DOMATESTE MOLEKÜLER MARKÖR YARDIMLI SELEKSİYONDA
KULLANILAN BELİRTEÇLERİN GEÇERLİLİĞİNİN KONTROLÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Ceylan Pınar Uçar

Bu çalışma Van YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından **2015-FBE-YL277** no'lu proje olarak desteklenmiştir.

VAN-2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Suat ŞENSOY danışmanlığında, Ceylan Pınar UÇAR tarafından sunulan **“Domateste Moleküler Markör Yardımlı Seleksiyonda Kullanılan Belirteçlerin Geçerliliğinin Kontrolü”** isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince .../.../2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Seyit Mehmet ŞEN

İmza:



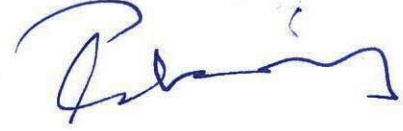
Üye: Prof. Dr. Suat ŞENSOY

İmza:



Üye: Yrd. Doç. Dr. Turgay KABAY

İmza:



Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 08/10/2017 tarih ve 2017.137 - I sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza
Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Suat ŞENSOY
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Ceylan Pınar UÇAR



ÖZET

DOMATESTE MOLEKÜLER MARKÖR YARDIMLI SELEKSİYONDA KULLANILAN BELİRTEÇLERİN GEÇERLİLİĞİNİN KONTROLÜ

UÇAR, Ceylan Pınar
Yüksek Lisans Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Suat ŞENSOY
Ağustos 2017, 61 sayfa

Bu çalışmada, domateste bazı hastalık ve zararlılar için geliştirilen SCAR ve CAPS markörlerinin moleküler markör destekli seleksiyon yardımıyla ülkemizdeki bazı domates çeşitleri ve genotipleri üzerinde geçerliliğini kontrol etmeyi amaçlanmıştır. Bu amaçla Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV), Fusarium solgunluğu (FOL), Domates yaprak kıvrıcıklığı virüsü (TYLCV), kök-ur nematodu (RKN), verticillium solgunluğu (Ve), domates mozaik virüsü (ToMV), gibi hastalıklar ve zararlılara dayanıklılık için geliştirilmiş olan moleküler belirteçler test edilmiştir. Bu hastalık ve zararlılar için geliştirilmiş olan belirteçlerden, TSWV için CAPS Sw5b-IRR, CT220 markörleri ve SCAR Scr-001, SCAR-421 markörleri, FOL için P7-43BF1, PTG-190, TAO1 CAPS markörleri ve P743BF1-P743BR1, P743DF3-P743DR3, P743DF1-P743DR1, At2F- At2R SCAR markörleri; TYLCV için SCAR P6-25 ve CAPS JB-1 markörleri, RKN için SCAR Mi-23 ve PMİ, TG-180 ve TG-263, CAPS APS ve C8B markörleri ve ToMV için Tomv markörü kullanılmıştır. Bu seçilen markörler 9'u ticari 12 yerli çeşit ve kontrol grubu Mountain merit, NCICELBR, NCI123S çeşitleri olmak üzere 24 domates genotipinde PCR yöntemiyle taraması yapılmıştır. TSWV; SCAR Scr-001 markörü, FOL; P7-43BF1, PTG-190, TAO1 CAPS markörleri ve P743DF3-P743DR3, P743DF1-P743DR1, At2-F- At2-R SCAR markörleri, TYLCV; geliştirilmiş olan SCAR markörleri, RKN'ye ait SCAR Mi-23 ve PMİ, markörlerinden sonuç alınabilmektedir. Bu bağlamda sonuç alınan SCAR ve CAPS belirteçlerinin domateste moleküler yardımcı seleksiyon çalışmalarında etkin bir şekilde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: CAPS, Domates, Moleküler markör yardımcı seleksiyon, SCAR, *Solanum lycopersicum L.*

ABSTRACT

VALIDITY CONTROL OF MARKERS USED IN MOLECULAR MARKER ASSISTED SELECTION IN TOMATO

UÇAR, Ceylan Pınar
M. Sc. Thesis, Horticulture Science
Supervisor: Prof. Dr. Suat ŞENSOY
August 2017, 61 pages

This study aimed to check the validity of the SCAR and CAPS markers developed for certain diseases and pests on some tomato cultivars and genotypes in molecular marker-assisted selection. For this purpose, developed molecular markers for resistance were tested for tomato wilt virus (TSWV), Fusarium wilt (FOL), Tomato leaf curl virus (TYLCV), root-knot nematode (RKN), verticillium (Ve), tomato mosaic virus (ToMV). SCAR-421 markers for TSWV, P7-43BF1, PTG-190, TAO1 CAPS markers and P743BF1-P743BR1, P743DF3- SCAR P6-25 markers for FOL; CAPS JB-1 markers which TYLCV; SCAR Mi-23 and PMI, TG-180 and TG-263 of RKN, CAPS APS and C8B markers for P743DR3, P743DF1-P743DR1, At2F- ToMV were selected. These selected markers were screened in 24 tomato genotypes 9 of which were commercial and 12 local genotypes as well as control group, Mountain merit, NCICELBR and NCI123S. For TSWV; SCAR Scr-001 marker, FOL; P7-43BF1, PTG-190, TAO1 CAPS markers and P743DF3-P743DR3, P743DF1-P743DR1, At2-F-At2-R SCAR for TYLCV; The SCAR P6-25 for RKN, the SCAR Mi-23 and PMI had gave results. In this context, it was concluded that the mentioned markers could be efficiently used in marker assisted selection studies in tomato.

Keywords: CAPS, Molecular marker assisted selection, SCAR, *Solanum lycopersicum* L.



ÖN SÖZ

Bu tez çalışmasında, katkılarından dolayı değerli danışmanım Prof. Dr. Suat ŞENSOY' a teşekkür ederim.

Denemenin kurulum aşamasında yardımlarını sunan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Çeknas ERDİNÇ'e teşekkür ederim. Denemeyi yürütme aşamasında Arş. Gör. Sibel TURAN, Arş. Gör. Metin KOÇAK'a ve Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'ne teşekkür ederim. Ayrıca Su Ürünleri Fakültesinden Sayın Prof. Dr. Muhammed ARABACI'ya ve Yrd. Doç. Dr. Şükrü ÖNALAN'a kapillar elektroforez imkanları için teşekkür ederim.

Tez jürimde yer alan ve değerli katkılarını sunan sayın Prof. Dr. Suat ŞENSOY Prof. Dr. Seyit Mehmet ŞEN ve Yrd. Doç. Dr. Turgay KABAY'a teşekkür ederim.

Tez çalışmasında tohum kaynağını sağlayan North Caroline Üniversitesi'nden Majid R. FOOLAD ve Dilip R. PANTHEE' ye, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Öğretim Üyesi Yrd. Doç Dr. Kenan SÖNMEZ'e ve tohum firmalarına teşekkür ederim.

Tez çalışmamın sonlanmasında, analizlerin yapımında emeği geçen değerli arkadaşlarım Mürşide HATİPOĞLU ve Emine TOSUN'a teşekkür ederim.

Tez çalışması esnasında manevi destekleriyle hep yanımda olan değerli hocalarım Nihat KOTLUK ve Orhan AYNA'ya teşekkür ederim. Ayrıca hiçbir zaman desteklerini benden esirgemeyen maddi, manevi yanımda olan değerli aileme teşekkür ederim.

Çalışmama maddi destek sunan Y.Y.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

2017

Ceylan Pınar UÇAR



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖN SÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ.....	8
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
3.1. Materyal.....	24
3.2. Yöntem	27
3.2.1. Domates bitkilerinin yetiştirilmesi	27
3.2.2. DNA izolasyonu	28
3.2.3. PCR analizleri.....	30
3.2.4. Jel görüntüleme	31
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	33
4.1. Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV)'ne ait markörlerin PCR analiz sonuçları	33
4.1.1. Scr-001 markörü	34
4.2. Fusarium solgunluğuna (FOL) ait markörlerin PCR analiz sonuçları.....	36
4.2.1. 43DF3-43DR3 markör analiz sonuçları	36
4.2.2. 43DF1-43DR1 markör analiz sonuçları	38
4.2.3. AT-2 markörüne ait analiz sonuçları	40
4.2.4. Ptg-190 markörü analiz sonuçları.....	42
4.2.5. TAO1 markörüne ait analiz sonuçları	43
4.3. Domates sarı yaprak kıvrıcıklığı virüsüne (TYLCV) ait markörlerin PCR analiz sonuçları	45
4.3.1. P6-25 Markörüne ait analiz sonuçları.....	45
4.4. Nematoda (RKN) ait markörlerin PCR analiz sonuçları	47

	Sayfa
4.4.1. Mi-23 markörüne ait analiz sonuçları.....	48
4.4.2. PMİ markörüne ait analiz sonuçları.....	51
4.5. Domates mozaik virüsüne (Tomv) ait markörün PCR analiz sonuçları.....	53
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	55
KAYNAKLAR.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....	61



ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. TSWV Domates lekeli solgunluk virüsü markörlerine ait bilgiler.....	18
Çizelge 3.2. FOL, Fusarium solgunluğu markörlerine ait bilgiler	18
Çizelge 3.4. Kök-ur nematodu markörlerine ait bilgiler	27
Çizelge 3.5. Verticillium solgunluğu markörlerine ait bilgiler	27
Çizelge 3.6. ToMV domates mozaik virüsü markörlerine ait bilgiler.....	29
Çizelge 3.7. Markörlerin annealing sıcaklığı	31
Çizelge 4.1. Scr-001 markör sonuçları	31
Çizelge 4.2. 43DF3-43DR3 markörüne ait sonuç	32
Çizelge 4.3. 43DF1-43DR1 markörüne ait sonuç	33
Çizelge 4.4. 4 At-2 markörüne ait PCR analizi sonuçları	34
Çizelge 4.5. PTG-190 markörüne ait PCR analizi sonuçları	35
Çizelge 4.6. TAO1 markörüne ait PCR analizi sonuçları	36
Çizelge 4.7. P6-25 markörüne ait PCR analizi sonuçları	37
Çizelge 4.8. Mi-23 markör sonucu	39
Çizelge 4.9. PMİ markör sonucu.....	40
Çizelge 4.10. ToMV markörüne ait PCR analizi sonuçları.....	41





ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. Domates tohumlarının viyollere ekilmesi	28
Şekil 3.2. DNA izolasyonu yapılacak domates bitkileri	28
Şekil 3.3. Pelet görüntüsü.....	29
Şekil 4.1 Scr-001 dominant markörü ile elde edilen 400bç markör	34
Şekil 4.2. 43DF3/R3 markörü PCR ürünlerinin Kapillar elektroforez görüntüsü.....	36
Şekil 4.3. 43DF1-43DR1 markörü PCR ürünlerinin Kapillar elektroforez görüntüsü...	38
Şekil 4.4. At-2 markörüne ait dominant markörü ile elde edilen 130bç markör.....	40
Şekil 4.5. Ptg-190'a ait elektroforez jel ile görüntüsü	42
Şekil 4.6. TAO1 markörüne ait PCR ürünlerinin jel görüntüsü	43
Şekil 4.7. P6-25 markörü PCR ürünlerinin Kapillar elektroforez görüntüsü	46
Şekil 4.8. Mİ23 markörü PCR ürünlerinin Kapillar elektroforez görüntüsü	49
Şekil 4.9. Mi-23'e ait elektroforez jel ile görüntüsü.....	49
Şekil 4.10. PMİ markörü PCR ürünlerinin Kapillar elektroforez görüntüsü	51
Şekil 4.11. Tomv markörüne ait dominant markörü ile elde edilen 950bç markör.....	53





SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
Bç	Baz çifti
°C	Santigrat derece
H	Heterozigot dayanıklı
MgCl	Magnezyum klorür
S	homozigot duyarlı
ddH ₂ O	Gram
µl	Mikrolitre
R	Homozigot dayanıklı
%	Yüzde
pH	Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
cm	Santimetre
Mm	Milimetre

Kısaltmalar	Açıklama
SCAR	Sırayla Karakterize Edilmiş Amplifiye Bölgeler
CAPS	Ayrılmış Amplifiye Polimorfik Dizilimler
AFLP	Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi
TSWV	Domates Lekeli Solgunluk Virüsü
TOMV	Domates mozaik virüsü
RKN	Domates kök-ur nematodu

FOL	Fusarium solgunluk hastalığı
TYLCV	Domates Sarı Yaprak Kıvrıcılık Virüsü
Ve	Verticillium
QTL	Kantitatif özellik bölgesi
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
FAO	Food and Agriculture Organization
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu



GİRİŞ

Personatae takımının solanacea familyasından yer alan domates türleri Peru'dan diğer ülkelere yayılmıştır ve Türkiye'deki ilk domatesin Adana'dan geldiği bilinmektedir. Domates yetiştiriciliğinde ülkemizin iklim şartlarının uygun olması ile sebze işleyecek sanayi 1970'li yıllardan itibaren hızla kurulmaya başlamıştır. Bundan dolayı ülkemiz domates üretiminde dünya ülkeleri arasında alt sıralardan hızla üst sıralara yükselmiş Amerika ve İtalya gibi ülkelerin arasına girmeyi başarmıştır (Şalk ve ark., 2008).

FAO'nun 2014 verilerine göre dünya domates üretimi yaklaşık 170.750.767 tondur. Çin 50 milyon ton ile ilk sırada yer almaktadır. Bu sırayı Hindistan ve ABD izlemektedir. Türkiye yaklaşık 12.600.000 ton domates üretimi ile dünyada % 7,2'lik paya sahip olarak ABD'den sonra 4. sırada yer almaktadır (FAO, 2017). Ülkemizin tüm bölgelerinde yetiştirilebilen domates en fazla sırasıyla Akdeniz, Ege ve Batı Karadeniz bölgelerinde üretilmektedir. Türkiye'de domates üretiminde birinci sırada Antalya iken bunu sırayla Mersin ve Muğla illeri takip etmektedir (TÜİK, 2017).

Türkiye'de domates üretim miktarının ve kalitesinin artırılmasına yönelik çalışmaların yanında domatesten elde edilen işlenmiş domates ürünlerinden çeşitli alanlar oluşturulmuştur. Günümüzde domates başta taze tüketimi yapıldığı gibi, domates suyu, salça, parça domates, ketçap, turşu olarak veya kurutulularak, dondurularak ve son zamanlarda tüketiciye sunulan domates reçeli ile insan beslenmesinde çok önemli bir yere sahiptir.

Domates meyvesi başlangıçta yeşil renklidir ve solanin maddesi ihtiva eder. Domates olgunlaştıkça solanin kaybolarak kırmızı renk alır. 100 gr taze domatesin ortalama % 94.1'i sudur. Domates bitkisinin içerisinde, A, B1, B, B6, C ve K vitaminleri, niasin, protein, yağ, karbonhidrat, potasyum, kalsiyum, demir ve bol miktarda likopen vardır. Bunlardan A, B6, B1, C vitaminlerinin ve likopenin antioksidandan kaynaklanan faydası sebebiyle kanserin bazı türlerine ve kalp hastalıklarına karşı koruyucu etkisi vardır (Şalk ve ark., 2008).

Günümüzde Türkiye'de ticari olarak yetiştiriciliği yapılan domates çeşitlerinin birçoğu çeşitli abiyotik ve biyotik etmenlere karşı duyarlıdır. Biyotik etmenlerden virüs,

nematot ve fungus gibi hastalık ve zararlı etmenlerinin sebep olduğu verim kayıpları domates üretimini düşürmektedir. Yetiştiriciliği yapılan domates çeşitlerinde hastalık ve zararlı etmenine karşı dayanıklılık genlerinin olmaması domatesin doğal olarak yetişen türlerinden dayanıklılık kaynağı olarak kullanılmasını sağlamıştır. Yabani domates türleri hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık geni taşımaktadır. İstenen özellikteki dayanıklılık genlerinin kültür domateslerine aktarılması ve yüksek verim özelliklerinin kazandırılması son yıllarda büyük öneme sahiptir (Pandey ve ark., 2003).

Klasik ıslah programlarında son yıllara kadar, bitkisel ürünlerde ilki hastalık ve zararlılar olmak üzere kültür bitkilerinin başka birçok tarımsal özelliklerinin iyileştirilmesinde büyük rol oynamaktadır. Klasik ıslah yöntemleri bazı durumlarda yetersiz olabilmekte ya da oldukça uzun zamana ihtiyaç olmaktadır. Bitki biyoteknolojisi yöntemleri dünyada olduğu gibi Türkiye’de de büyük önem kazanmaktadır. Tarımsal açıdan öneme sahip olan genler genetik haritalar kullanılarak, kültür çeşitlerine etkili bir şekilde, hızlı ve kolaylıkla aktarabilmektedir (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

Domates yetiştiriciliğinde hastalık ve zararlı etmeninden kaynaklanan ürün kaybını düşürmek için kimyasal ve kültürel önlemler alınmaktadır. Bununla birlikte pestisitlerin üründe kalıntı bırakması, kültürel uygulamaların hastalığın kontrolünde yetersiz kalması tekrar uygulamalara sebep olması ve çevreye olan zararlı etkilerden dolayı son yıllarda bitki dayanıklılık genleri büyük öneme sahip olmuştur. Dayanıklı çeşit kullanımından faydalanmak en etkili yöntem olarak kabul edilmektedir (Agrios, 1997).

Belirteç destekli seleksiyon yöntemi (marker assisted selection, MAS) yabani gen kaynaklarından gen transferleri, resesif allellerin ortaya çıkarılması ve seleksiyonu, erken seleksiyon, gen izolasyonu ve klonlanmasında kullanılmaktadır. Klasik bitki ıslahı, melezleme sonucu elde edilen ve açılım gösteren döllere arasından üstün genotiplerin fenotipik seleksiyonuna dayanmaktadır. Fakat genotip ile çevre etkileşimi sebebiyle uygulama oldukça zorlaşmaktadır. Aynı zamanda fenotipik seleksiyonun maliyetli olması sebebiyle bazı özellikler için (abiyotik stres koşullarına tolerans gibi) çoğu durumlarda uygulanamayabilir. MAS, klasik bitki ıslahında bu belirtilen sorunlara karşı geliştirilen bir yöntemdir. Islah programlarında istediğimiz genle bağlantılı

markörlerin kullanılmasının potansiyel faydaları yön değiştirmiş ve araştırmacılar 1970'lerin sonuna doğru DNA markörlerinin geliştirilmesiyle yeni bir çalışma alanı ortaya çıkmıştır. Özellikle domatestte hastalıklara dayanıklılık genleriyle ilişkili markörler geliştirilerek ıslah programlarında kullanılmaktadır. Şimdiye kadar 40'dan fazla gen (tek gen ve QTL) haritalanmıştır (Grube ve ark., 2000). MAS tekniği oldukça hızlı, etkili, güvenilir ve ekonomik bir seleksiyon tekniğidir. Fakat bu teknik tek başına klasik ıslah metotlarının yerine geçebilecek bir teknik değildir, klasik ıslah çalışmalarının başarısı atırmacı ve yardımcı bir yöntemdir (Sönmezoğlu ve ark., 2010).

MAS'ın kullanılmasının avantajları, çevre etkisi nedeniyle örtülen genotiplerin tespit edilmesinde kolaylık sağlamaktadır; Ayrıca resesif genler güvenli bir şekilde belirlenebilir ve analizi yapılacak olan hat-çeşit-genotip sayısı büyük ölçüde azalır. Araştırmanın başında istenmeyen özelliklerin çoğu elemine edileceği için daha efektif bir ıslah düzeni oluşturulabilir. Daha fazla işe yarayan genotiplerin işe yaramayanların yerine test edilme kolaylığı sağlar. Geriye melezleme ile dayanıklılığın aktarılmasında kolaylık sağlaması, genler arasındaki bağlantının kırılmasında kolaylık sağlaması, taranması zor olan özelliklerin belirlenmesinde kolaylık sağlaması ve erken dönemde genotip bilgisi elde edilebildiği için aynı bireyler çaprazlanıp sezon kazanılabilir. Karantina kapsamındaki bazı hastalık ve zararlılara dayanıklılık için testlemeye gereksinimin olmaması ile daha az sayıda bitki ile çalışmaya imkan sağlayarak iş gücü ve maliyet bakımından avantaj sağlaması olarak sıralanabilir. Moleküler markörlerin ıslahta kullanılmasında markör tipi çok önemlidir. Bu yüzden özellikle MAS'ta ko-dominant markörler kullanılmaktadır. Heterozigot ve homozigot bireyleri ko-dominant markörler ayırabilme özelliğine sahiptir. MAS programları dominant özelliklerin yanında genellikle ko-dominant SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) ve CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) markör sistemleri üzerine yoğunlaşmıştır (Collard ve Mackill, 2008).

Bu markör sistemlerinin alet ve ekipmana, işgücü ve maliyete gereksiniminin diğer yöntemlere göre daha az gereksinim duyulması avantaj kazandırmaktadır (Kumar, 2009).

Domates lekeli solgunluk virüsü, domates mozaik virüsü, nematod, fusarium, domates sarı yaprak kıvrıcıklığı virüsü, verticillium solgunluğu hastalıkları ve zararlıları dünyada olduğu gibi Türkiye’de de önemli verim kayıplarına neden olmaktadır.

Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV), 1915’de Avustralya’da tespit edilmiştir. Virüsün vektörü olan *Frankliniella occidentalis* Perg. tripsinin kıtaya yayılması ile diğer ülkelerde de hastalık saptanmaya başlamıştır (Cho ve ark., 1986). Türkiye’de Tekinel ve ark. (1969), Mersin ili çevresinde yetiştiriciliği yapılan çeşitli sebzelerde bu virüsün belirtilerine rastlamıştır. Çanakkale’de bütün yetiştirilen bölgelerde görülmüş, bunun ardından Balıkesir, Manisa, Uşak ve Samsun illerinde de tespiti yapılmıştır (Azeri, 1981). 1997 yılında Şanlıurfa’da domates yetiştirilen alanlarda Güldür (1997) tarafından TSWV etmeninin olduğu ilk kez rapor edilmiştir. Hastalığın olduğu bitki yapraklarında başlangıçta bronzlaşma, benekleşme, kıvrılma ve nekrozis oluşmakta ve bunu sürgünlerde geriye doğru ölüm, gövde ve yan dallar üzerinde nekrozis izlemektedir. Olgunlaşmamış meyvelerde meyvenin rengine göre daha açık yeşil renkte halka biçiminde lekeler görülmekte, meyve rengini almaya başladığında bu lekeler sarı olarak belirginleşmektedir (Güldür, 1997).

Domates mozaik virüsü (TOMV), bitki özsuynun mekanik inokulasyonu, aşılamayla ve kültürel işlemler sırasında bitkilerin birbirleriyle temas içerisinde olmasıyla, tohumla ve bazı ısıricı-çiğneyici ağız yapısındaki böcek türleri aracılığıyla taşınmaktadır. TOMV sistematik bir şekilde konukçunun kök, gövde ve yapraklarında bulunmaktadır. Ayrıca tohumun dış yüzeyinde, tohum kabuğunda ve nadir olarak tohum endosperminde de rastlanabilmektedir. Genel olarak hastalığın belirtileri yaprakların üzerinde görülen renk değişikliklerinin gözlemlenmesidir. Bu renk değişikliği sarı, açık yeşilden koyu yeşile ve mozaik şeklindedir. Yaprakta koyu yeşil bölgeler açık yeşil bölgelere göre daha hızlı bir şekilde gelişmekte ve bu bölgeler daha kalın ve kabarık bir görüntü oluşturmaktadır. Bunun sonunda ise yapraklarda kıvrılma ve deformasyonlar meydana gelmektedir (Güllü ve Çalı, 1994).

Domates kök-ur nematodu *Meloidogyne* spp. (RKN), tamamen bitkinin kök kısımlarına yapışarak beslenen bir parazittir. Domateste kök ur nematodları, bitki köklerinde oluşturduğu yumrular ile varlıkları belli olur ve nematodlar bu oluşan urlar içerisinde kendine yaşam alanı sağlamaktadır. Bu urlar, bitkideki su dolaşım sistemini

bozar ve kökün yapması gereken işlevleri engeller. Domates bitkisinde gelişme yavaşlar ve durur, bodurlaşma meydana gelir. Domates yaprak kısımlarında sararma, çiçek ve meyve dökülmeleri görülür. Enfeksiyon ağır bir pozisyona gelirse bitki tamamen kuruyabilir. Nematodun zarar derecesi popülasyonun yoğunluğuna ve bitki çeşidine göre farklılık göstermektedir. Genellikle domates ve patlıcanda %25-35 Aralığında zarara neden olmakta, bu oran bazen %50-60'a kadar yükseliş göstermektedir (Kaur ve ark., 2014).

Fusarium solgunluk hastalığı, (*Fusarium* spp.), solgunluk etmeni, tropik ve subtropik iklim şartları ve özellikle kumlu topraklarda daha zararlı olduğu görülmektedir. Fungal hastalık etmeni fungus toprakta misel ve spor formunda, özellikle dayanıklı sporları olan kladiospor olarak olumsuz şartları geçirirler. Tohum ve toprak kökenli bir hastalık etmenidir. Enfekteli bitkilerden elde edilen tohumların yaklaşık % 3'nün bulaşık olduğu tespit edilmiş ve fungus tohum kabuğu alt kısmına yerleşmektedir. Fide döneminde hastalık belirtisi ilk olarak solgunluk olarak görülür ve daha sonraları fidelerin ölmesine kadar gidebilir. Yaşlı bitkilerde belirtiler ise, yaprak damarlarının açılması, bitkilerin bodurlaşmanın görülmesi, alt yapraklarının sararması, adventif kök oluşumu (yeni kök oluşumu), yaprak ve dallarda solgunluk görülmesi ve yaprak kenarlarında nekrozların meydana gelmesi şeklindedir. Sera koşullarında solgunluk belirtileri genellikle gün ortasında ve sıcak havalarda kendini belli etmektedir. Belirtileri genellikle bitkinin veya yaprağın bir kısmında veya yarısında görülmektedir. Köklerde görülen belirtiler ise özellikle küçük yan köklerin siyah bir renk alması ve daha sonrada çürümeye yol açması şeklindedir. Köklerin ölmesinin sonucunda da bitkiler sararır ve solarlar. Bitki gövdesinin toprak yüzeyine yakın olan kısmında enine kesite bakıldığında, iletim demetlerinde kahverengi bir halka olduğu görülür (Foolad ve Panthee, 2012).

Domates Sarı Yaprak Kıvrıcılık Virüsü (TYLCV), domates yetiştiriciliğini etkileyen en önemli hastalıklardan birisi olup, geminivirüs (çift parçacık halinde) grubundandır ve beyazsinek ile taşınır. TYLCV oldukça geniş bir konukçu dizisine sahiptir. Konukçularının bazılarında hiç belirti bulunmazken, hastalık o bitkide bulunabilir ve ergin beyazsinekler ile sağlıklı bitkilere taşınır. Virüs mekanik olarak bazı baffırlar kullanıldığında taşınabilir, fakat pratikte mümkün olmayabilir. Domateste

enfeksiyondan 2-3 hafta sonra belirtiler görülmeye başlar. Erken dönemde virüse maruz kalan domates bitkileri belirgin bir şekilde bodur kalırlar. İlerleyen dönemlerdeki enfeksiyonlarda sürgünlerde gelişme geriliği ve şekil bozukluğu ortaya çıkar. Bu hastalık nedeniyle bazı yerlerde %80'e varan ürün kaybı saptanmıştır. Yapraklar kenarları boyunca sararır ve yapraklar karakteristik olarak yukarı doğru kıvrılmasıyla fincan veya kaşık görüntüsünü alarak, küçülür ve kalınlaşır (Luna ve ark., 2012).

Verticillium, düşük seviyede olan toprak sıcaklıklarında doğal olarak meydana gelmekte ve duyarlı bitkilerde hastalığa neden olmaktadır. *V. albo-atrum* en iyi şekilde 20-25°C sıcaklıklarda gelişim gösterirken, *V. dahliae* 25-28°C gibi biraz daha yüksek sıcaklıklarda daha iyi gelişme gösterdiği saptanmıştır. Hastalık sıcak bölgelerde, özellikle sulak alanlarda problem olmaktadır. Fungus çok yıllık bitkilerde, bitki kalıntılarında ve vejetatif üreme organlarında kış şartlarını misel olarak geçirir. Bundan dışarda küçük, siyah, tohuma benzer yapısındaki mikrosklerotları (dayanıklı üreme organı) sayesinde 10 yıl veya daha uzun süre toprakta canlı kalabilme özelliğine sahiptir. Bu oluşumlar dayanıklı bitkilerde herhangi bir belirti göstermezken ince yapılı kökler üzerinde veya içerisinde de oluşabilir. Bu sklerotlar duyarlı ya da dayanıklı bitkilerin kökleri tarafından salgılanan salgılar tarafından çimlenmeleri teşvik edilir. Böylece fungus duyarlı olan bitkilerin köklerini enfekte eder ve korteks dokularında kolonize olurlar. Bitki dokusunda meydana gelen konidisporları su ile bitkinin üst aksamalarına taşınarak fungus bitkinin iletim dokularında kolonize olur. Hastalığı tespit etmede hastalıklı bitkilerde fungal yapıları tespit etmek mümkün olmadığından, laboratuvar kültürü yapılmalıdır. Hastalık etmeni bitkilerin iletim demetlerinde görülür, özellikle kurak iklim koşullarında yapraklar pörsüyerek solar, alt yaprakların uç kısımdan itibaren sararır ve bitki boylarında farklılıklar ortaya çıkar. Genellikle yaprakların bir kısmı yeşil kalırken, diğer kısmı solmuş olarak görülür. Yaprak ayasında kahverengi ve kül grisi lekeler görülür, yaprak sapları uzun süre yeşilliğini korur ve sağlıklı gibi görülen bitkilerin gövdesi kesildiğinde kahverengi lekeler ve açık renkte kabukların olduğu görülür. Bitki iletim demetlerinde kolonileştikleri için fungal bitkilerde yan kök oluşumu meydana gelebilir. Bitki ölümü nadir görülür, ancak alt yaprakların tamamının kurummasından dolayı büyük ölçüde verim kaybı yaşanmaktadır (Pegg ve Brady 2002).

Moleküler belirteçler, farklı özellikleri ve karakterleri DNA düzeyinde ölçen ve araştırılan genotiplerde istenen bir geni ya da özelliği izlemek için kullanılabilen araçlardır. Modern ıslah programlarında birden fazla dayanıklılık geninin ıslah hat veya çeşitlerine aktarılması hedeflenmektedir. Moleküler belirteçler 1980’den itibaren birçok bitkide yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle domateste hastalıklara dayanıklılık genleriyle bağlantılı markörler geliştirilerek ıslah programlarında kullanılmaktadır (Grube ve ark., 2000). Moleküler belirteçlerin geliştirilmesi, kantitatif karakterlerle çalışmayı daha kolay hale getirdiğinden dolayı büyük ilgiyle karşılaşılmıştır. Mevcut tez çalışması, domateste farklı araştırmacılar tarafından geliştirilen markörlerin ülkemizdeki bazı domates çeşitleri ve genotiplerinde çalışıp çalışmadığı kontrol etmeyi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

Domates (*Solanum lycopersicum* L.; Sinonim: *Lycopersicon esculentum* Mill.) dünyada yaygın bir şekilde yetiştiriciliği yapılan sebze türlerinden biri olarak bilinmektedir. Taze sebze olarak tüketilmesinin yanında aynı zamanda işlenmiş ve paketlenmiş olarak tüketilmektedir. Domates tüketimi 1985'den bu yana dünyada ortalama %10 artmıştır. Bunun sebebi domatesin besin değerinden kaynaklanmaktadır. Domates A-C vitaminlerinin önemli bir kaynağıdır. Dahası son çalışmalar, domatesin kırmızı renk almasındaki önemli bir bileşeni olan likopenin önemini tespit etmiştir. Antioksidan özelliğe sahip bir madde olan likopen kanser ve kalp hastalıklarına karşı koruyucu etkisi tespit edilmiştir (Durant, 2008).

Bitkilerde bitki ıslahında kullanılan belirteç tipleri morfolojik belirteçler, biyokimyasal belirteçler ve DNA belirteçleri olarak sıralanabilir. DNA belirteçleri, sekansa spesifik olmayanlar rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD), çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP) sekansa spesifik olanlar basit dizi tekrarı (SSR), basit sekans tekrarlamaları arası polimorfizmi (ISSR) ve son yıllarda yoğunluk kazanan organel mikrosatellitleri, sekansı karakterize edilmiş yani belirlenen çoğaltılmış bölgeler (SCAR), bölünerek çoğaltılmış polimorfik diziler (CAPS), RAMP, SRAP, TRAP, SSCP olarak sıralanır. DNA belirteçlerinin bitki ıslahında genetik kimlik tanısı ve akrabalık düzeylerinin belirlenmesi, hibrit bitki tanısı, belirteç yardımı ile seleksiyon, bulk segregasyon analizi ve tohum ıslahında rolü vardır. Son yıllarda moleküler biyolojide görülen hızlı ilerleme, bitki genetiği çalışmalarında, genetik çeşitliliğin korunması, korunması, üretimi ıslah gibi hedefler doğrultusunda kullanımına önemli ölçüde katkısı vardır. Genetik teknolojileri doğru yönlendirilip desteklendiğinde insanlığa faydalı olabilir (Vardar-Kanlıtepe, 2010).

Biyoteknolojinin üstünlüğü moleküler markörleri, moleküler haritaları ve markör–destekli seleksiyon (MAS) teknolojilerini kullanarak klasik bitki ıslah yöntemlerini destekleyen bir yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır. Özellikle moleküler markör teknolojisi karmaşık özellikleri kontrol etmekte olan birçok genin (Quantitatif

trait loci: QTL) sayılarını ve bireysel, interaktif etkilerini ve kromozom üzerindeki yerini belirlemekte kolaylık sağlamaktadır (Tanskley ve ark., 1989).

Dayanıklılık genlerine bağlı olan moleküler markörlerin tanımlanması iki nedenden önemlidir: birincisi bu markörler dayanıklılık fenotipinden ziyade markör genotipine bağlı olarak seleksiyona izin vermektedirler, ikincisi moleküler markörler istenmeyen bağlantı sürüklenmesini azaltabilmektedirler. Hastalıklara dayanıklılık genlerine bağlı moleküler markörleri bulmak için büyük projeler gerçekleştirilmektedir. Bu projelerden birisi domates genomunu ortaya koymaya çalışan *Solanacea* Genome Project (SGN) olup domates genomu çalışılmaktadır. Erken yanıklık hastalığına dayanıklı domates haritası oluşturmak amacıyla Fooland ve 8 arkadaşları tarafından geriye melez (BC1) popülasyonları kullanılarak genetik kaynak *S. habrochaites* (sinonim. *L. hirsutum*) da kantitatif karakter lokus (QTLs) etkilerinin büyüklüğü ortaya konulmuştur (Fooland ve ark., 2002).

Gözel ve ark. (2016)'nın moleküler markörler ile ilgili yaptığı derlemeye göre morfolojik ve biyokimyasal belirteçler yapılarındaki çeşitli dezavantajlardan dolayı günümüzde yerini moleküler markörlere veya moleküler markörler ile birlikte karşılaştırılmalı olarak çalışmalarda kullanılmaktadır. DNA temel alınarak yapılan teşhislerde görülen polimorfizm morfolojik ve biyokimyasal markör yöntemlerinde gözlemlenenlere göre oranı daha yüksektir. Bu çalışmada nematodların belirlenmesinde daha sık moleküler markörler olarak (Jones ve ark., 1997; Powers ve Fleming, 1998), RFLP, AFLP, ISSR, SSR, STR (Mikrosatellitler), SNP, RAPD ve DNA dizi analizi yöntemleri hakkında bilgi verilmiştir. RFLP yöntemi, ilk ve en eski moleküler markör tekniğidir. Kesme enzimlerinin DNA zincirindeki özellikli 4-8 çift bazlık nükleotid dizilerini tanıyarak kesme yerleri olarak bilinen kısımlardan kesmesi esasına dayanır. AFLP tekniği, RFLP yönteminden farklı olarak kesme enzimleri ile kesilen DNA parçalarının PCR ile çoğaltılması esasına dayanır (Zabeau ve Vos, 1993; Avise, 2004). Bu teknikte 2 aşamalı PCR uygulaması vardır. Mikrosatellitler, 1-6bp uzunluğunda tekrar dizileri olup, DNA dizilerinin tekrar eden en küçük birimleridir. Tautz (1989) tarafından keşfedilmişlerdir. Basit Dizi Tekrarları SSR, Kısa Bitişik Tekrarlar STR olarak ifade edilmiştir. SSR'lar yaygın olarak kodlayıcı olmayan bölgelerde bulunmaktadır. Replikasyon kayması ve crossing-over gibi mutasyonların sonucunda

meydana gelen yüksek seviyede tekrar eden uzunluk polimorfizmleri tarafından karakterize edilirler (Schlötterer ve Tautz, 1992). RAPD yöntemi, 6-10 bazlık tek markörlerin kullanılması ile genom üzerindeki bölgelerin PCR kullanılarak rastgele çoğaltılmasına dayanan bir tekniktir. SNP, Tek nükleotid polimorfizmi geniş bir popülasyonun çok küçük bir bölümünde meydana gelen DNA dizisindeki tek nükleotid çiftinin değişmesini ifade eder. Sonuç olarak morfolojik yöntemlerin nematodun belirlenmesinde yetersiz kaldığı görülmüştür. Bunun yanında moleküler markörlerin uygulanması hızlı ve kesin sonuçlar alınabilmesinden dolayı günümüzde sıklıkla başvurulan yöntemlerden birisi olmuştur (Gözel ve ark., 2016)

Kök-ur nematodunun sera ve tarla koşulların çok büyük zararlara sebep olduğu bilinmektedir. Devran ve Elekçioğlu yaptığı bu çalışmada, domates bitkisi *M. incognita* ya enfekte edilerek dayanıklı ve duyarlı hatlar nematoda dayanıklılık analizleri sonucuna göre, Kök-ur indeksi derecelerinin duyarlı bitkilerde 2'den büyük olduğu görülmüştür. Dayanıklı bitkilerde bu değer 2 ve 2'den küçük olduğu belirtilmiştir. Üreme oranlarında, dayanıklı bitkilerde 0, duyarlı bitkilerde ise 1'den büyük olduğu görülmüştür. Ayrıca Mi lokusuna özgü C1/2 VE C2S4 markörleri kullanılarak dayanıklı ve duyarlı bitkiler PCR ile analizi yapılmıştır. Bunun sonucunda dayanıklı bitkilerde DNA bant aralığı 1.6 kb bulunurken, duyarlı bitkilerde bant elde edilmemiştir. Burada elde edilen sonuçlar doğrultusunda, geleneksel yöntemle kullanılan dayanıklılık testleri ile moleküler destekli çalışmaların birbirlerini destekleyen bir durum ortaya koyduğu ve bu markörlerin ıslah programlarında kullanılabileceği ortaya konmuştur. (Devran ve Elekçioğlu, 2004).

Domates ıslah programlarında yaygın bir şekilde kullanılan moleküler markörler, aynı zamanda genin homozigot mu ya da heterozigot mu olduğunu göstermeye yardımcı olmaktadır. Aydınli (2015)'nın yaptığı bir derlemede, bu moleküler belirteçler arasından REX-1'in, virüse dayanım sağlayan Ty-1 geni taşıyan domates bitkilerinde hatalı pozitif sonuçlar verdiği bildirilmiştir. Domates sarı yaprak kıvrıcılığı virüsüne dayanıklılık sağlayan Ty-1 geni de 6. kromozom üzerinde bulunmaktadır. Bunun sebebinin ise aynı lokusta ve birbirlerine çok yakın bulunmasından REX-1 belirtecinin Ty-1 geni taşımakta olan bitkilerde test edildiğinde hatalı sonuçlar verdiği ortaya çıkmıştır (El Mehrach ve ark., 2005; Devran ve ark.,

2013). Özellikle, *Solanum habrochaites* ve *Solanum chilense*'den gen aktarımı yoluyla oluşturulan hibrit domateslerde REX-1 belirtecini kullanılmaması gerektiği söylenmiştir. Bu sebeple, Ty-1 geni taşımakta olan domates bitkilerinde kök-ur nematoduna olan dayanıklılığı tespit etmek için Pmi-12 ve Mi-23 belirteçleri dizayn edilmiştir (Aydınlı, 2015).

Domateste sarı yaprak kıvrıcıklığı virüsü ve kök- ur nematodu ağır verim kayıplarına sebep olmaktadır. Her iki patojene karşı yetiştirmede kullanılan direnç genleri mevcuttur. Yetiştiricilikte dayanıklı gen allelleri için moleküler belirteçler dayanıklı bitkilerin seçimini büyük ölçüde kolaylaştırır. En sık kullanılan direnci kullanmada markör yardımcı seleksiyon yapmak için çoklu Polimeraz Zincir Reaksiyonu geliştirilmiştir (PZR=PCR). Farklı 20 domates genotip takımından homozigot durumda dört domates sarı yaprak kıvrıcıklığı kombinasyonu ve 1 adette kök-ur nematodu dayanıklı gen allellinin farklı kombinasyonlarını taşıyan hem yaprak kıvrıcıklığı virüsünde hem nematodlarda duyarlı bir hatta Ty-1 Ty-3 direnç genlerini taşıyan yerli 2 domates çeşidi LA-1969 LA-1932 çoklu PCR analizini incelemek ve geliştirmek için kullanılmıştır. Ty-1/3 markırı, Ty1-3 lokusunda sadece dayanıklı ve duyarlı allelleri ayırmıştır. Fakat Ty/1, Ty/3 veya Ty/3a dayanıklı alleller arasında olmadığı görülmüştür. Yeni dizayn edilen Ty-1/3 belirteci Ty-1/3 alleli için homozigot bitkilerde güvenilir bir şekilde direnç görülmüştür. Homozigot bitkileri Ty-2 lokusunda dayanıklı ve duyarlı allelleri SSR ve SCAR belirteçlerinin her ikisinde tespit etmiştir. Fakat LA1932' ye bağlı *S. chilense*'den anormal bir bant elde edilmiştir ve bu Ty-2'ye duyarlı yabancı genin *S. lycopersicum*'dan farklı bir Ty-2 alleli içerdiğini belirtir. Birden fazla genin dizilmesinde en etkili yöntemlerden biri markör yardımcı seleksiyonu kullanmaktır. Bu tanımlanan çoklu PCR üç önemli yaprak kıvrıcıklığı virüsünün direnç bölgesi taşıyan yabancı domates türü olan *S. chilense*, *S.habrochaites* ve *S. peruvianum*'u güvenilir bir şekilde tespit etmiştir (Chen ve ark., 2015).

Klasik yöntemler ile domates ıslahında da moleküler markörler yoğun bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle kantitatif gen lokusu (QTL) ve tek gen ile kontrol edilen birçok biyotik streslere dayanım için bir çok belirteç tasarlanmıştır. Bu çalışmanın amacı bazı domates zararlı ve hastalıkları için tasarlanmış olan moleküler belirteçlerin MAS (Markör Yardımlı Seleksiyon) ile incelenerek elde edilen sonuçların

ıslah yöntemini uygulayanların hizmetine sunmaktır. Bu amaçla, Tütün mozaik virüsü (TMV), Domates mozaik virüsü (ToMV), Domates sarı yaprak kıvrıcıklığı virüsü (TYLCV), Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV), *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, *verticillium dahliae*, nematot (*Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne incognita* ve *Meloidogyne javanica*) hastalık ve zararlı dayanımına bağlı olarak tasarlanmış moleküler belirteçler test edilmiştir. Bahsedilen hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık sağlayan Mi1 ve Mi2 geni, Ty-1, Ty-3a geni, Sw-5, I-1, I-2 ve genleri için geliştirilmiş markörlerin MAS kullanılarak kullanım potansiyeli belirlenmiştir. Belirtilen bu hastalık ve zararlılar için belirlenmiş iki adet F1 domates çeşidinin kendileme yapılmasıyla ortaya çıkan 92'şer adet F2 domates popülasyonunda, söz konusu hastalık ve zararlılara dayanıklılık sağlayan yedi adet genle ilişkili olarak geliştirilmiş olan 11 adet SCAR markörü ve CAPS markörü test edilmiştir. Nematoda dayanımı sağlayan Mi-23 markörü kullanılarak 92 adet F2 domates hattında 25 tanesinde homozigot dayanıklılık bandı (430bç), 19 adedinde homozigot duyarlı bandı (380bç) elde edilmiştir ve 48 adedinde ise hem dayanıklı hem de duyarlı bant elde edilmiştir. Verticillium hastalığında kullanılan Ve2 markörü testlemesinde 21 adet dayanıklı bandı (242bç), 19 adet duyarlı bandı (131bç) ve kalan 54 adedinde her iki bant elde edilmiştir. Fusarium solgunluğu hastalığında ise I-1 ve 2 allelleri ile ilişkili olarak I-1 alleli için kullanılan At-2 belirtecinin sonucunda 92 adet içinden 66'sında tek dayanıklılık bandı (130bç) elde edilmiştir. I-2 alleli için geliştirilen Tao CAPS markörü test edildikten sonra 92 adet domates hattından 20 adet dayanıklı (500bç), 25 adet duyarlı (250bç) ve 47 adedinde hem duyarlı hem duyarlı bant elde edilmiştir. Domates lekeli solgunluk virüsünde Sw-5 geni için tasarlanan Sw-5 markörü SCAR yöntemiyle test edildikten sonra 26'sında dayanıklılık bandı (550bç), 23'nde duyarlı bandı (500bç), 43 adedinde ise heterozigot dayanıklılığı sağlayan duyarlı ve dayanıklı bant elde edilmiştir. TYLCV yani domates sarı yaprak kıvrıcıklığı virüsünde yapılan incelemede dayanımı sağlayan 4 gen vardır ve bunlardan 2 tanesi Ty-1 ve Ty-3 alleli için tasarlanan sırasıyla Jb-1 CAPS markörü için test sonuçları 92 genotipten 64 (500bç ve 400bç) adedinde heterozigot bant elde edilmiştir. 26'sında duyarlı bant (400bç) elde edilmiş hiç homozigot dayanıklılık bandı (500bç) elde edilmemiştir. Ty-3a alleli için P6-25 markörünün test edilmesinden sonra 24 'ünde homozigot dayanıklı bant (650bç), 50

adedinde her iki bant (450bp ve 650bp) elde edilirken 18'inde duyarlı bant (450bp) elde edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda anlaşılmaktadır ki belirtilen hastalık ve zararlılara karşı moleküler belirteçler klasik testlemeye göre dayanıklı hat ve çeşit geliştirmede kolaylık sağlayabilmektedir (Pınar ve ark., 2013).

Domateste kök-ur nematoduna karşı dayanıklılık geni olan Mi-1,2 geninin tespiti için Mi-23 ko-dominant SCAR markörü kullanılmıştır. Mi-1 direnç geni 1940'ta *Solanum peruvianum* çeşidinden ortaya çıkartılmıştır ve modern domates yetiştiriciliğinde halen kök-ur nematoduna tek kaynaktır. Domateste Rex-1 CAPS markörü denemelerde yaygın olarak kullanılmaktadır ve güvenilirliği kanıtlanmıştır. Ancak El-mehrach ve ark. çalışmasında (2005) *Solanum habrochaite*'den ortaya çıkarılan ve Ih902 den türetilen begomovirüs-direnç geninin bazılarında sahip mevcut Mi-1 geni için Rex-1 markörünün pozitif hata bulunmuştur. Mi-1,2 geni mevcut ise sadece bir PCR bölümüne göre dizayn edilmiştir. Fakat bu markörler heterozigot bitkileri ayıramamıştır. Bu çalışma Mi-1 lokusunda yer alan Mi-1,2 geni için Mi-23 ko-dominant SCAR markörünü açıklamaktadır. Ko-dominant SCAR markörü, önceki PCR'a dayalı markörlere göre daha avantajlı olduğu ve Mi-23, Mi-1,2 genine daha sıkı bağlı olduğu bulunmuş. *S. habrochaites*'den ortaya çıkarılan begomovirüs dayanıklı ıslah hatlarına pozitif hata vermemiştir. Bu çalışmada Ih902 için sırasıyla REX-1, Mi, Mi23 ve Ty-1 markörleri bulunmuştur. Diğer germplazmlar için bu sonuç farklı olabilmektedir. TY52 (Ty-1,Ty-1), REX-1, Mi23, TY-1 (TG97) *S. chilense* sekansına sahiptir. Gh2'de, REX-1, Mi23 ve Cor-Mi markörleri *S. peruvianum* sekansına sahiptir. Bundan dolayı Mi1-2 geni ile Ty-1 geni arasında bağlantıyı kırmanın mümkün olduğunu göstermişlerdir (Garcia ve ark., 2007).

El Mohtar ve ark. (2007)' nın yaptığı çalışmada *F. oxysporum* I-2'ye dayanımı sağlayan markör geliştirilmiş ve bu markör aynı ırka dayanıklılığı tespit edilen 40 adet domates genotipinden taraması yapılmıştır. 39 adedinde bu dayanıklılığı sağlayan I-2 genine ait bant elde edilmiştir. Sadece 1 adet domates genotipinde istenen bant elde edilememiştir. Bu metodun 3 farklı ülkede yapılan moleküler ve klasik testlemelerle yapılmış çalışmalarla geçerliliğini koruduğu bildirilmiştir (El-Mohtar ve ark., 2007).

Domateste kök-ur nematoduna dayanıklılık sağlayan Mi1-2 geninin Mi23 SCAR markörü ile belirlenmesi için yapılan bu çalışmada 18 adet domates genotipinin kök-ur

nematodu olan *M. javanica*'ya karşı dayanıklılık durumları ve dayanıklılık şekilleri (homozigot veya heterozigot) moleküler markör yöntemiyle araştırmışlardır. Rex-1 markörü CAPS yöntemiyle denenmiş taq1 enzimiyle 3 bant elde edilmiştir. Bu bantlar 750bp homozigot duyarlı bireyleri, 570-160bp homozigot dayanıklı ve 3 bant aynı anda var ise heterozigot dayanıklı bireyleri göstermektedir. 18 genotipin 4 adedinde homozigot duyarlı, 13 adedinde heterozigot dayanıklı ve 1 tanesinde homozigot dayanıklı bant elde edilmiştir. Bu 18 domates hattı Mi23 marköründe de denenmiş burada kesme enzimine kullanılmadan 2 bant elde edilmiş. Bu bantlarda 430bp tek bant veren duyarlı, 380bp tek bant veren dayanıklı her iki bant elde edilmesinde durumunda heterozigot dayanıklı bireyler elde edilmiştir. 18 domates hattından 1 adet homozigot dayanıklı, 4 adedinde duyarlı bant ve diğer 13 domates genotipte heterozigot dayanıklı bant elde edilmiştir. Rex-1 CAPS markörüyle SCAR Mi23 markörünün paralellik gösterdiği bu çalışmada SCAR Mi23 ile duyarlı ve dayanıklı bitkilerde herhangi bir enzim kullanmadan duyarlı, heterozigot ve homozigot dayanıklı bireyleri rahatlıkla ayrılabilmiştir (Özarslandan ve ark., 2010).

Domateste *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* ırkı-3' e direnç için I-3 geninin tespit etmek için CAPS ve SCAR markörleri kullanılmıştır. Barillas ve ark. (2008), I-3 geni için ko-dominant 2 SCAR (P7-43DF1 P7-43DF3) markırı geliştirmek için ve 2 CAPS (PTG-190 ve P7-43BF1) belirtecinin değerlendirilmesini amaçlamıştır. CAPS Ptg-190 markırı *S. penelli* kaynaklı fol 3 ırkına dayanıklılık sağlayan I-3 yerine yönelik CAPS markörleri çalışılmış ve PTG -190 markör çiftiyle elde edilen 765 bazlık DNA Alu1 enzimiyle kesilmesi sonucu dayanıklı bant olarak 249bp duyarlı 165bp'lik bir parçacık belirlenmiştir. CAPS P7-43BF1/R1 markör çifti Nsi-I kesme enzimiyle istenilen kısım kesildiğinde neredeyse 365bp ve 730bp aralığında bant elde edilmiştir yedi genotipten üçünde heterozigot bant yani iki bant elde edilmiştir. SCAR 43dF1\R1 markör çifti duyarlı genotiplerde 1060bp'de dayanıklı genotiplerde 1270bp' de bant elde edilmiştir. SCAR 43DF3/R3 belirteci hibrit ve yerli çeşitler olmak üzere farklı genotipler üzerinde test edilmiştir. Duyarlı bantlar 650bp aralığında ve dayanıklı bantlar 875bp aralığında elde edilmiştir. Bu denemenin sonucunda I-3 geniyle iki CAPS markörü ve bir ko-dominant SCAR markörünün bağlantılı olduğu değerlendirilmiştir ve

domates tohum hatlarında markör destekli seleksiyon kullanılabileceği belirtilmiştir (Barillas ve ark., 2008)

Bu çalışmada, yazarlar *Meloidogyne incognita*'ya karşı nematoda direnci olan belirteçlerin domates genotiplerinde kullanılabirliği ve tekrarlana bilirlğini incelemişlerdir. Mi-1 geni ile bağlantılı olan belirteçlerin geçerliliğinin domates genotiplerinde kök-ur nematoduna karşı taranmasında 32 domates genotipi kullanılmıştır. Bitkilere kök ile inokulasyondan sonra 90 günlük beklemenin ardından değerlendirmeye alınmıştır. CAPS Aps, C8b, Rex-1, Ct-119, SCAR Pmi ve Mi-23 markırları kullanılarak domates genotiplerinin taraması yapılmıştır. H-88-78-1 ve diğer 3 çeşit olan Hisar Lalit Motello ve Mogeor 'un aralarında bulunduğu Mi1-2 genin *M.incognita*'ya karşı dayanıklılık gösterdiği görülmüştür. Bu dört genotipin ıslah programlarında kullanılabileceği tespit edilmiştir. SCAR Pmi ve Mi-23 markörlerinin diğer belirteçlere göre kesme enzimi kullanılmadan heterozigot ve homozigot bireyleri ayırabilmesinden dolayı daha avantajlı bulunmuştur (Reddy ve ark., 2016)

Solanum peruvianum'dan aktarılan domateste bakteriyel solgunluk direnci olan UPV-1 ıslah hattında Sw-5 alleliği araştırmak ve domates yetiştiriciliğinde direnci arttırabilmek için yapılan bir çalışmadır. Bu çalışmada kullanılan hatların dayanımı TSWV'nin kalıtımını çalışmak için mekanik inokulasyon ve trips geçişi kullanılmıştır. Sw-5 ile bağlantılı SCAR Scr001F/R dominant markör çifti kullanılmış ve 100bç ladder'da 400bç baz uzunluğunda sonuç vermiştir. Sw-5'te çalışan SCAR markırı UPV-1 de benzer şekilde çalışmış ve ticari hibrit çeşitlerinin geliştirilmesinde UPV-1'in önemli olduğunu göstermişlerdir (Rosella ve ark., 2001).

Domateste Sw-5 geni TSWV' ye karşı önemli bir hastalık direnç kaynağıdır. CAPS markörü ile bu gen açık bir şekilde bağlantılı olduğu rapor edilmiştir. Sw-5 lokusu karakteristik bir bölge olmasına rağmen spesifik bir gen markörü geliştirilmemiştir. Bu denemede Sw-5 gen sekansını içeren dominant bir markörünün eşit bir şekilde üretmesiyle oluşan PCR' a dayalı yöntem ile belirtilen genotipler ve pozitif bir kontrol olarak CAPS markörleri ile çalışılmıştır. Markör olarak Sw-5b-LRR markörü Mse I ile kesme enzimiyle kesildikten sonra 119bç aralığında bant elde edilmiştir. Ct- 220 markörü AseI kesme enzimiyle kesildikten sonra yaklaşık olarak 100 bç 'de başarılı olarak bant aralığı vermiştir (Garland ve ark., 2005).

Ghandi ve ark. (2006)'nın Ürdün'de domates lekeli solgunluk virüsünün oluşumunu araştırdığı çalışmada Ürdün Vadisi'nde ilk kez domates solgunluk virüsünün semptomlarının ortaya çıkmasıyla farklı yetiştiricilik yapılan yerlerde araştırmalar yapılmış ve hastalığın semptomları görülmüştür. Kendi domates lekeli solgunluk virüsü enfeksiyonuna tepkileri için önceden geliştirilmiş domates yaprak kıvrıcılığına karşı direnç için geliştirilen domates hatları ve hibritler test edilmiştir. TSWV'deki dayanıklılık geni olan Sw-5 lokusu *L. previonum*'dan *L. esculantum*'a aktarılmıştır. PCR ile TSWV'nin tespitini yapmak için SCAR421 markörü kullanılmıştır. Beklenen bant aralığı duyarlı allellerde 900bp ve dayanıklıda 940bp olarak bildirilmiştir. Hibrit çeşitte her iki aralığın elde edilmesiyle heterozigot olduğu ortaya çıkmıştır. Tüm test edilen hatlar ve hibrit çeşitler duyarlı olduğu gözlenmiş ve TSWV 'nin direnç geni Sw-5 ile bağlantılı olan SCAR 421 belirtecini kullanarak moleküler seviyede onaylanmıştır (Ghandi ve ark., 2006).

Begomovirüs'e karşı ıslah direnci, tüm dünyada ıslah programlarında önemli bir hedef olmuştur. Bu zamana kadar begomovirüse karşı direnç yabani türler kullanılarak aktive edilmiştir ve en az beş Ty direnç geni çalışılmıştır. Bu çalışmada Ty-2 ve Ty-3 birleştirmek ve çalışmada 3 çeşit begomovirüs türü ile domates enfeksiyonu üzerine pramitlenerek etkisini belirlemek için yapılmıştır. Ty-3 geniyle bağlantılı SCAR P6-25 markörü kullanılmıştır. Gc4 ve Gc171 hatlarda Ty-3 ile ilişkili olanlar duyarlı çeşitlerde 450 bazlık dayanıklı çeşitlerde 650 bazlık bir uzunluk oluşturmuştur. Ty-1 geniyle bağlantılı C2-At5g6151 marköründe 1000 bazlık bir uzunlukta teşhisi güçlendirilmiştir. P6-25 ve C2-At5g61510'un birleştirilmesiyle oluşturulan analizlerde, LA3473, CA4 ve GC171'deki Ty-1 / Ty-3 genini ayırt etmiştir. SCAR P6-25 markörü ve C2-At5g61510 birlikte kullanıldığı takdirde başarılı sonuç vermiştir. Bu çalışmada geliştirilen domates hatları domates yaprak kıvrıcılığı virüsünden etkilenen bölgelerde yetiştiricilik yapılan domates alanlarında önemli genetik kaynak olabilecektir (Prasanna ve ark., 2015).

Danso ve ark. (2011)'nin yaptığı bu çalışmada bazı domates genotipleri üzerinde kök-ur nemotodunun dayanıklılık geni olan Mi/1-2 gen lokusunu tespit etmek için Mi23F/R markör çifti kullanılarak moleküler görüntülemesi 28 farklı domates genotipinde denenmiştir. 28 genotipin altısında duyarlı genotipi tespit eden 380 baz uzunlukta bant elde edilmiştir. 6 dayanıklı genotip 430 baz uzunluğunda ve 5

heterozigot yani her iki bant aralığı elde edilmiştir. Bu çalışmanın sonunda kök-ur nematoduna karşı dayanıklı domates genotipleri için Mi genine özgün belirtecin kullanımının güvenilir, zamanında ve etkili bir tarama olduğunu açıkça göstermiştir (Danso ve ark., 2011).

Kuklev ve ark. (2009); dayanıklı ve duyarlı domates genotiplerinin *Verticillium solgunluk* direnci lokusunun nükleotit dizilerini klonlayıp analiz etmişlerdir. Daha önce klonlanmış Ve1 ve Ve2 genlerine yüksek derecede homoloji gösteren nükleotit dizileri, *Verticillium solgunluğuna* duyarlı domates biçiminde tespit edilmiştir. Ve1 direnç geni için CAPS markörü VVF1 ve Ve2 direnç geni için VVF2 markör çiftleri kullanılmıştır. Dayanıklı ve duyarlı bitkiler arasındaki bu lokustaki polimorfizm saptanmış ve oldukça etkili bir CAPS markörü geliştirmek için kullanılmıştır (Kuklev ve ark., 2009).

İslah programları süresince, birçok direnç geni farklı yabancı domates genotiplerinden yetiştiriciliği yapılanlara aktarımlar yapılmıştır. Bu direnç geni kromozom 6'da haritalanmıştır ve bunlar arasında bulunan Ty-1 ve Mi direnç vermektedir. Castro ve ark. (2007)'nin çalışması Ty-1 ile ilgili bilgilendirici bir moleküler markör bulmak amacıyla yapılmıştır. Ty-1 ve Mi allellerinin farklı kombinasyonlarını taşıyan bitki materyallerinde analiz edilmiş ve 6 markör Ty-1 olarak aynı bölgede haritalanmıştır. Aps-1, Rex-1, JB-1 ve CT216, CT119, GP79 markörleri test edilmiştir. Aps-1 için farklı domates genotiplerinden yapılan çalışma sonucu 300-700bp'lik ko-dominant bant elde edilmiştir. Rex-1 için yaklaşık olarak 750bp ve 570, 160bp'lik bant elde edilmiş ve bu allellerin ko-dominant olduğu tespit edilmiştir. Jb-1 markörü 300-500 ve 700 bazlık bir bant edilmiştir. 6 markörün bu üçünde polimorfizm gözlemlenmiş fakat diğerlerinde gözlemlenmemiştir. 3 polimorfik belirteçle yabancı domates genotiplerinin analiz edilmesi sonucu yetiştirilen bitki materyallerinde allellerin kökenini oluşturmaya izin verdi. *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium* ve *S. habrocaites*'ten aktarılanlar sonuca müdahale etmeyeceğini gösterdi. Ayrıca burada gösterilen sonuçlar Ty-1'e bağlantılı JB-1 markörünün bir allelini tanımlamasına izin vermiştir. Bu markör Mi veya bazı diğer genlerin varlığına müdahale etmeyeceği düşünüldüğünde markör destekli seleksiyonda Aps-1'den daha yararlı olduğu elde edilmiştir (Castro ve ark., 2007).

Kök-ur nematodu sıcak iklim bölgelerinde ve tropik bölgelerde yaygın olmasının yanında sera ve diğer kontrollü üretim sistemlerinin bulunduğu yerlerde de yaygındır. Kök-ur nematodunun 3 türü olan *Meloidogyne* spp 'ye domateste geni Mi-1 direnç verir. Ancak Mi-1 geni 28 °C'de aktif değildir. Önceki çalışmalarda *Lycopersicon peruvianum*'dan LA2157 yabani türünün kromozom 6'ya karşı yeni bir dayanıklı nematod direnç genini tespit edilmiştir ve haritalanmıştır. Duyarlı LA392 ve dayanıklı LA2157 arasında çaprazlamasından ortaya çıkarılan F₂ ve F₃ progenleri elde edilir, Mi-9 geni dizayn edilmiştir. Ammiraju ve ark. (2001), *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne arenaria* ve *Meloidogyne incognita*'nın üç Mi-1-availulent biyotipine karşı bu ısıya dayanıklı dayanıklılığın daha fazla karakterize edildiğini bildirmişlerdir. LA2157' sıcaklık sabit direncinin kalıtımı F₂ ve F₃ döllerıyla değerlendirilmiştir. DNA tarafından üretilen polimorfizm test edilmiştir. LA2157 ve LA392'nin her ikisinde CT119 markörü MseI kesme enzimiyle kesildikten sonra homozigot dayanıklı (280-170bç) ve duyarlı (250-170bç) bireyler ve heterozigot (280-250-170bç) bireyler elde edilmiştir. Bundan dolayı ko-dominant bir markör özelliği göstermektedir. Rex-1 markörü taqI kesme enzimiyle kesildikten sonra LA2157'de 162-570bç iki bant elde edilmiştir, fakat LA392'de ayrılma görülmemiştir. Aps-1 için taq enzimiyle kesilmesi ile LA2157 de 1.0 ve 0.6 boyutunda ayrılmıştır. Fakat LA392'de ayrılma görülmemiştir. Bundan dolayı Rex-1 ve Aps her ikisinde ko-dominant bir özellik göstermektedir. C8b markörü LA392 360bç'lik bant elde edilmiş, LA2157' de ise 400bç ve 360bç'lik bant elde edilmiş. Bundan dolayı dominant bir markördür. *Javanika* ve W4 izolatıyla 32 CG 'de sıcaklık sabit direnci F₂ popülasyonunda 162 dayanıklı ve 52 duyarlı gen ile sonuçlanmıştır. F₃ genotiplerinde 16 dirençli, 15 duyarlı 30 dayanıklı ve duyarlı bant elde edilmiştir. Bu Mi-9 monogenik baskın kalıtımını onaylar. *M. Javanica*'ya sıcaklık-sabit direnci olan bütün F₂ bireyleri yüksek sıcaklıkta *M. arenaria* ve *M. incognita*'ya dayanıklı olarak kaydedilmiştir. Bu da Mi-9' un üç türede sıcaklık sabit direnci verdiğini göstermektedir (Ammiraju ve ark., 2003.)

Domateste Tm2² lokusuyla yakından bağlantılı olan PCR'a dayalı ko-dominant bir markör geliştirilmiştir. Bu baskın lokus domateste ToMV'ye direnç verir. Bu çalışmada Tm2² lokusuyla bağlantılı olan yeni bir RAPD markörü tanımlanmıştır ve RAPD polimorfik sekansına dayalı olarak ToMV dayanıklı ve duyarlı bireyler arasında

ayrımı olan SCAR markörü dizayn edilmiştir. F₂ popülasyonunda SCAR analizi yapılmıştır. Homozigot ToMV dayanıklı bitkileri 950bp bant göstermiştir. Homozigot duyarlı bantlar ise 500bp de görülmüştür. Heterozigotta ise her iki bantta elde edilmiştir. Ko-dominant bir markör olarak özellikle homozigot dayanıklı ve duyarlı ebeveynler arasındaki çaprazlamadan ortaya çıkan hibritlerde tohum üretiminin kalitesi için uygun bir araç olduğu tespit edildi (Dax ve ark., 1998).

Özellikle fenotipik olarak önemli özelliklere bağlı moleküler belirteçler, özelliklerin gözlemlenmesi zor ve maliyeti yüksek olduğu zaman önemli ölçüde ilgi çekmektedir. Bu çalışmada Arens ve ark. (2010)'nın (moleküler markörleri Tm₂, Tm², Mİ1-2 geni Fol ırkından I-2 geni birçok çeşitte denemişlerdir. Bunlar PBR testinde zorunlu özelliklerdir. Mi bölgesi *S. peruvianum*'dan gelen kromozom 6'nın kısa bir bölümüdür. Mi1-2 bölgesi için dört markör belirlenmiştir. Bunlardan biri olan Pmi markörü PCR' a dayalı olarak anonim olarak seçilen domates genotiplerinde denendikten sonra duyarlı 350bp, dayanıklı 550bp de bant aralığı vermiştir (El Mehrach ve ark., 2005). Tm1 lokusu *S. habrochaites*'den gelen ToMV dayanıklılık geni içerir. Bu gen kromozom 2'de haritalanmıştır. Tm₂, Tm² allellerinin kökeni *S. peruvianum*'dan gelmektedir ve Tm2 lokusunda tanımlanmıştır. Tm2 lokusu kromozom 9'a yakın olarak haritalanmıştır. ToMV için iki CAPS markörü dizayn edilmiş ve üçlü allellerin PCR' a dayalı olarak üçlü markör ARMS-PCR, SNP tespiti kullanılarak geliştirilmiştir. CAPS markörüne bir alternatif olarak geliştirilen dörtlü ARMS-PCR'ına dayalı olan bir ko-dominant geliştirmek için kullanılan SNP's denemelerinin sonucunda tmv226 SNP marköründe yapılan denemede tm2 de dayanıklı bant 214bp' de oluşmuş, Tm² de ise 255bp de dayanıklı bant oluşmuş fakat duyarlı bant görülmemiştir. Tm2 748 marköründe 179bp dayanıklı 382bp duyarlı bant elde edilmiştir. *Verticillium dahlia*' ya karşı geliştirilen direnç geni Peru *S. lycopersicum* hattından aktarılmıştır ve bu lokusunun kromozom 9'da haritalanmıştır. Ve1 ve Ve2 spesifik markörleri dayanıklı ve duyarlı çeşitlerde parçaları çoğalmak için geliştirilmiş markörlerdir. Bu parçalar SNP's ları bulmak için dizilenmiştir. Ve1 markörü 476bp dayanıklı bandı, 158bp duyarlı bandı elde edilmiştir. Ve2 marköründe 242bp dayanıklı bandı 131bp duyarlı bandı elde edilmiştir. *V. dahlia*'nın sekansı dayanıklı ve duyarlı çeşitler arasında bulunan SNP's ların dörtlü markör ARMS-PCR denemelerini geliştirmek için kullanılmıştır. *Fusarium*

oxysporum f. sp. *lycopersici* ırkı 0 a direnci I lokusu *S. pimpinellifolium*'dan aktarılmıştır. Kromozom 11'in kısa bir parçasında haritalandırılmıştır. Bu bölge için SCAR dominant At2 markör çifti çeşitli domates genotiplerinde denenmiştir. Dominant olan bu markörde dayanıklı bandı 130bp'de baz elde edilmiştir (Shi ve ark., 2011).

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* ırkı çoğu domates yetiştiriciliği yapılan yerlerde verim kaybına sebep olmaktadır. Domates ıslah programlarında dayanıklı belirteçler geliştirmek yararlı olmaktadır. Bundan dolayı *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* ırkı 2' ye direnç kazandıran I-2 genine sahip olan domates genotiplerini tanımlamak için CAPS TAO1₉₀₂ markörü geliştirildi. Bu markör RsaI kesme enzimiyle kesildikten sonra 500 bp'de iki parçaya ayrılarak 390bp duyarlı ve 410bp dayanıklı bant elde edilmiştir. 100 F₂ genotipinden 16 dayanıklı 20 duyarlı genotip elde edilmiştir. I-2 geniyle bağlantılı olan CAPS TAO1₉₀₂ markörü domateste kullanışlı olabileceği rapor edilmiştir (Staniaszek ve ark., 2007) .

İsrail'de ilk kez domates yetiştiriciliği yapılan alanlarda domates direnç geni Mi-1'e karşı zararlı *Meloidogyne* izolatlarının davranışı çalışılmıştır. Dayanıklı (Mi taşıyan) ve duyarlı (Mi taşıyan olmayan) domates çeşitlerinde birbirini izleyen üç kuşak üzerinde seçilen yedi izolat virülansı teyit edilmiştir. Teşhis markörleri, dayanıklı domates çeşitlerinde veya anaçlarda seçilen virulent izolatlar arasında *Meloidogyne javanica*'nın baskınlığını doğrulandı. Mi taşıyan bitkiler üzerinde nematod seçiminin belirleyicilerini daha iyi anlamak için, Mi-avirulant ve virulent izolatların Mjav1 ve Mjv2 üremesi, sırasıyla kök gramı başına yumurta olarak Mi taşıyan, heterozigot (Mi / mi) ve Homozigot (Mi / Mi) genotipleri değerlendirilmiştir. Mi/Mi genotiplerinde hiçbir Mjav1 çoğalması gözlenmemesine rağmen, bazı üreme Mi/mi bitkilerinde sürekli olarak gözlenmiştir; Homozigot ve heterozigot genotiplerde Mjv2 üremesi duyarlı çeşitlerinkine benzer; bu da Mi geni için sınırlı miktarda niceliksel etki olduğunu düşündürmektedir. Mi-virulent izolatların neden olduğu büyük hücrelerin histolojik incelenmesi Mi/mi ve Mi/Mi genotiplerinde Mjv2'nin yüksek toksikliliğini doğrulanmış ve Mi genine rağmen iyi gelişmiş olan büyük hücreli sistemlerin oluşumuna izin vermiştir. Domateste Mi/Mi, Mi/mi ve mi/mi genotiplerindeki bitki savunma tepkisinin, avirulant ve virulent izolatlara analizi niceliksel gerçek zamanlı PCR ile araştırılmıştır. İnokulasyondan önce tüm domates genotipleri Mi allellik durumları için PCR'a dayalı

olarak PMİ ve Mİ23 markörleri kullanılmıştır. Jasmonat (JA) sinyal yolunun duyarlı ve heterozigot bitkiler üzerinde virulent ve virulent olmayan izolatlar tarafından açıkça yukarı doğru düzenlenmiş olmasına rağmen, virulent olmayan izolat ile uyumsuz etkileşimden sonra homozigot dayanıklı hatta sinyal değişikliği gözlemlenmemiştir. Bundan dolayı duyarlı genotip üzerinde virulent olmayan izolat tarafından teşvik edilen enfeksiyona benzer şekilde, mi-virulent izolatı homozigot dayanıklı çizgiyle uyumlu etkileşim sırasında domates duyarlılığını geliştirebilen bir yol başlatmıştır. Bu sonuçlar domates yetiştiriciliğini sürdürebilmeye Mi direnç geninin yönetimi için önemli bir sonuç olmuştur (Iberkleid ve ark., 2011).

Bu çalışmada Guatemala'da geliştirilen begomovirüs dayanıklı ıslah hatları, kök-düğüm nematoduna direnç için Mi-1 lokusuyla bağlantılı olan CAPS belirteçleri REX-1 ve Cor-Mi test edilmiştir. Her iki belirteç, *M. incognita*'ya duyarlı ve *L. hirsutum* (Ih902hattı) veya *L. chilense* (TY52 hattı) introgressions'a sahip olan birkaç ıslah hattı için yanlış pozitif sonuçlar vermiştir. İki yabancı türün *L. peruvianum* ve *L. chilense*'den introgressions'a spesifik SNP'ler ve indeller, iki CAPS belirteçleri için tanımlanmıştır. Mi-1.2 geninin 3 'bölgesi için spesifik REX markörleri ve PCR markörleri (PM3Fb / PM3Rb) içeren bir multipleks PCR geliştirilmiştir. Test edilen her bitki DNA'sı REX markörleri için 720bp'lik bir parça verdi, ancak sadece Mi-1.2 geni olan bitkiler PM3Fb / PM3Rb markörleriyle birlikte denendiğinde 500bp'lik bir fragman vermiştir. Bu multipleks PCR, Mi-1.2 geni için heterozigot genotipleri tespit edemediğinden, Le-Mi-1 lokusu, Lp-Mi1 lokusu ve Lip-Mi-1 lokusu için benzersiz parça boyutları sağlayan markörler SCAR PMiF3 / PMiR3 ile başka bir PCR yöntemi kullanılmıştır. Lc-Mi-1 lokusunun yanı sıra, Ih902-Mi-1-locuslu begomovirüs dayanıklı hatlarıyla birlikte çalışıldı. PMiF3 / PMiR3 620bp ile 720bp aralığı vermiştir. Bu çalışmanın sonucunda bu iki PCR protokolü, özellikle 6S kromozomunda aktarılan begomovirüse dayanıklı genlere sahip ebeveyn hatları Rex-1 VE Cor-Mİ ile ıslah programlarında kullanılabileceği ortaya konulmuştur (El Mehrach ve ark., 2005).

Domates E427 hattı, *L. pimpinellifolium* PI 126915 kalıtımı ve *L. pinelliden* ortaya çıkarılan virulent olmayan *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*'nin üç ırkına duyarlı geni olmuştur. Fusariumun spesifik ırkına direncini belirlemek için E427 hattı 'Bonny Best' kullanılmıştır ve sonra F₂ ve geriye melezleme ile tohum elde edilmiştir.

Kendi kendine tozlanmanın sonucunda. İrk 2 ve 3'ün her ikisine dirence sahip dört hat gözlemlenmiştir ve ırk 1'e duyarlı bulunmuştur. Kromozom 7 ve I-3 ile bağlantılı RFLP markörlerinde *L. pennellii* allelleri bulunmaktadır. Kromozom 11' de I ve I/2 ile bağlantılı *L. pimpinellifolium* allellerinde eksiklik vardı. F₂ kayıtları gösterdi ki ırk 2 direnci tek bir dominant gen ile kromozom 7' de kontrol edilmiştir. Üç hat İrk 2'ye dirençli fakat ırk 1 ve 3'e duyarlı olarak bulunmuştur. Bu hatlar, TG105'te *L. pimpinellifolium* alleli ve I-2 varlığını gösteren 14,4 cm'lik bölgeyi kapsayan ve I-3'e bağlanan belirteçlerde *L. pennellii* alleli olmayan bitişik işaretleyicilere sahip bulunmuştur. Üç hat, ırk 1'e dirençli, ancak ırk 2 ve 3'e karşı duyarlı bulunmuştur. Üç hattın tümünde TG523'te *L. pimpinellifolium* alleli bulunur ve 11 numaralı kromozom üzerinde I ile olan bağlantıyı teyit eder ve I-3'e sıkıca bağlanan belirteçlerde *L. pennellii* alleli yoktur. Bununla birlikte, 415 çizgilerinden birinde, CT113'te 7. kromozom üzerinde *L. pennellii* alleli bulunmaktadır (Scott ve ark., 2004).

Bayram ve ark. (2007)'nın yaptığı çalışmada domateste karşılıklı rekombinant yakın çevrenin (RIL) demir (Fe) tolerans düzeyini belirlemek olmuştur. RIL'ler (F₆ üretimi) 1994 yılından bu yana uzun süreli çalışmalar için hoşgörülü ve hassas yakın ebeveynleri kullanılarak yaratılmıştır. İkinci amaç demir eksikliği toleransı için niceliksel nitelik lokusuna (QTL) haritalamak için kullanılabilecek verileri elde etmektir. Domateste bu çalışmada toplam 224 genotip kullanılmıştır. 107 genotip toleranslı ebeveynin sitoplazmasını içermektedir. Bitkiler hidrofobik ortam büyüme odasında yetiştirildi. RIL'lerin ölçülen parametreleri normal dağılımları gösterilmiştir. Aktif, toplam ütüler ve klorofil konsantrasyonları için RIL'ler arasında anlamlı farklılıklar ortaya çıkmıştır. Domateste demir eksikliği toleransını niceliksel olarak miras olduğu ve çoklu genler tarafında kontrol edildiği sonucuna varılmıştır (Bayram ve ark., 2011).

İslah programlarında, yeni hibrit çeşitleri elde etmek ve mevcut hibrit çeşitlerin geliştirilmesinde klasik ıslah yöntemleri ve markör belirteçli seleksiyon olmak üzere iki önemli yöntemdir. Klasik ıslah yöntemi, uzun vadede ve fenotipik bulgulara dayanmaktadır. Fakat MAS, fenotipik özellikten etkilenmez ve genotipe dayalı olduğu için zamandan tasarruf edilmektedir. Bu çalışmada domatesi morfolojik özellikleri ve ekonomik değerine göre özellik bakımından arttırılmış domates genotipleri

geliştirilmiştir. F_2 ve F_3 ıslah hatları, yüksek verimliliğe sahip MS1453 melezinden geliştirilmiştir. Fenotipik özellik bakımından skorlanmıştır. Bu domates hatlarının belirlenmesi ve QTL bölgesini belirlemek için F_2 popülasyonunda CAPS ve SSR markörleri ile taraması yapılmıştır. Ayrıca, FOL, ToMV, RKN, Ve, TYLCV, 261 bireyde hastalığa direnç gösteren yeni kaynakların belirlenmesi için test edilmiştir. Ne yazık ki domates hatları düşük polimorfizme sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Sınırlı polimorfizm sebebiyle QTL'in çok az olduğu gözlemlenmiştir. Daha küçük polimorfizmleri tespit etmek ve QTL haritalama gücünü artırmak için daha yüksek etkinliğe sahip SNP'ler gibi farklı bir işaretleyici yöntem kullanılması gerektiği ifade edilmiştir (Özbek, 2016).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada 24 domates genotipi kullanılmıştır. Domates genotiplerinin 9 adedi F1 hibrit çeşit (Alkan F₁, Olgun F₁, Servet F₁, Çiko F₁, Alsancak F₁, Merkür F₁ ve Cazibe F₁), 15 adet farklı bölgelerden temin edilmiş olan yerel çeşitler (Erzurum sırık, Van sırık, Siirt yerli1, Siirt yerli 2, Gönen, Sencan sırık, Köylüm, Armut, Yayla, Sırık kapıdağ, Oturak geleneksel ve Patika) bulunmaktadır. Bunların içerisinde North Caroline Üniversitesi'nden temin edilmiş olan Mountain Merit, NCICELBR ve NC123S kontrol genotiplerinin hastalık ve zararlılara dayanıklılık durumları bilinmektedir. 10 CAPS markörü 11 SCAR markörü belirlemek üzere 21 adet markör çifti kullanılmıştır. Bu markörler aşağıda belirtilmiştir (Çizelge 3.1-3.6).

Çizelge 3.1. TSWV Domates lekeli solgunluk virüsü markörlerine ait bilgiler

Gen	Markör	Markör tipi	Markör ID	Markör dizilimi
Sw-5	CAPS	Ko-dominant	Sw5b-IRR	F=TCTTATATTGTGGAGTTTTGTCTG R=GTTCTGACCATTACAAAAGTAC
Sw-5	CAPS	Ko-dominant	CT220	F=AAGCCGAATTATCTGTCAAC R=GTTCTGACCATTACAAAAGTAC
Sw-5	SCAR	Dominant	Scr-001	F=CTGGGTGAGTCTTGACAT R=CTGGGTGAGTACATCAGATT
Sw-5	SCAR	Ko-dominant	SCAR-421	F= GACTTGTTGCCATAGGTTCC R= GCCCACCCCGAAGTTAATCC

Çizelge 3.2. FOL, Fusarium solgunluğu markörlerine ait bilgiler

Gen	Markör	Markör tipi	Markör ID	Markör dizilimi
I-3	CAPS	Ko- dominant	P7-43B	F=CAGTCATTATTAACAAATTTTCAGGATCG R=TCTGAGCAATACGTCTAGCAGC
I-3	CAPS	Ko- dominant	PTG-190	F=GCAGTACACTTCTCCTTATCATGTG R=AGTTTCAGTAGTTGTTCCAAATTCC
I-3	SCAR	Ko- dominant	P743DF1 P743DR1	F=GGTAAAGAGATGCGATGATTATGTGGAG R=GTCTTTACCACAGGAACTTTATCACC
I-3	SCAR	Ko- dominant	P743DF3 P743DR3	F=CACGGGATATGTTRTTGATAAGCATGT R=GTCTTTACCACAGGAACTTTATCACC
I-1	SCAR	Dominant	At2-F At2-R	F=CGAATCTGTATATATTACATCCGTCGT R=GGTGAATACCGATCATAGTCGAG
I-2	CAPS	Ko- dominant	TAO1	F=GGGCTCCTAATCCGTGCTTCA R=GGTGGAGGATCGGGTTTGTTC

Çizelge 3.3. TYLCV Domates yaprak kıvrıcıklığı virüsü markörlerine ait bilgiler

Gen	Markör	Markör tipi	Markör ID	Markör dizilimi
Ty-3	SCAR	Ko- dominant	P6-25	F=GGTAGTGGAATGATGCTGCTC R=GCTCTGCCTATTGTCCCATATATAACC
Ty-1	CAPS	Ko- dominant	JB-1	F=AACCATTATCCGGTTCACTC R=TTTCCATTCTTGTCTCTG

Çizelge 3.4. Kök-ur nematodu markörlerine ait bilgiler

Gen	Markör	Markör tipi	Markör ID	Markör dizilimi
Mi-1	SCAR	Ko-dominant	Mi23	F=TGGAAAAATGTTGAATTTCTTTG R=GCATACTATATGGCTTGTTTACCC
Mi-1	SCAR	Ko-dominant	Pmi	F=GGTATGAGCATGCTTAATCAGAGCTCTC R=CCTACAAGAAATTATTGTGCGTGTGAAT G
Mi-3	SCAR	Ko-dominant	TG-180	F=ATACTTCTTTGCAGGAACAGCTCAC R=CACATTAGTTGATCATAAAGTACCAG
Mi-3	SCAR	Ko-dominant	TG-263	F=GCTGAGAAATAAAGCTCTTGAGG R=TACCCTTAATGCTTCGGCAGTGG
Mi	CAPS	Ko-dominant	Aps	F=GGAACGTGGGTAGCATATGA R=GCCAATGCTCATCAATGTGA
Mi	CAPS	Ko-dominant	C8B	F=TACCCACGCCCCATCAATG R=TTGCAAGAGGGTGAATATTGAGTGC

Çizelge 3.5. Verticillium solgunluğu markörlerine ait bilgiler

Gen	Markör	Markör tipi	Markör ID	Markör dizilimi
Ve	CAPS	Ko-dominant	VVF2	F=GACTACATTGACCCTGGG CTCTTG
			VVR2	R=TGAGAGCACCTTAAGCTT TTC AAT
Ve	CAPS	Ko-dominant	Ve1YP-F	F=CTTCCACAATGGCAAACCTTAGA
			VeYP-R2	R=TGGGGAAATGTGAAAGAGGT

Çizelge 3.6. ToMV domates mozaik virüsü markörlerine ait bilgiler

Gen	Markör	Markör tipi	Markör ID	Markör dizilimi
Tm	SCAR	dominant	ToMV	F=CACCTTTCCCCTAAAGC R=CACCTTTCCCTCTCCAA

3.2. Yöntem

Bu çalışma 24 domates genotipi üzerinde SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) ve CAPS (Cleaved Amplified polymorphic Sequence) markör yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. SCAR ve CAPS markör yöntemi çalışmamızda belirlenen hastalık ve zararlıya göre sekansa özgü markörler PCR ortamında çoğaltılmasıyla gerçekleşmiştir. Markör çiftleri farklı sekans veri kayıtlarından oluşturulan belli karakterlere özgü markör çiftleridir. CAPS markör tekniğinde gen spesifik markör çiftleriyle PCR ortamında çoğaltılan amplifikasyon ürünleri kesme enzimleri ile kesilmiştir (Jiang ve ark. 1997). Yirmi dört domates genotipi üzerinde uygulanan SCAR ve CAPS markör tekniği için DNA izolasyonu Doyle ve Doyle (1990)'a göre geliştirilmiş olan CTAB metoduna göre yapılmıştır.

3.2.1. Domates bitkilerinin yetiştirilmesi

Çeşitli bölgelerden temin edilen yerli ve hibrit çeşit tohumlar Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü iklim odasında her çeşitten on'ar tane olacak şekilde gruplandırılarak viyollara ekimi yapılmıştır (Şekil 3.1). Yaklaşık 15-20 gün sonra bitkilerde 2/3 gerçek yaprak dönemindeyken genç yapraklardan örnek alınmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. Domates tohumlarının viyollere ekilmesi.



Şekil 3.2. DNA izolasyonu yapılacak domates bitkileri.

3.2.2. DNA izolasyonu

Bitkilerden alınan genç yapraklar 2 gün -80 °C'de bekletildikten sonra liofilizatörde kurutma işlemi yapılmıştır. Hücresel organellerin ortaya çıkması, hücre duvarının parçalanmasını sağlamak için kimyasal işlemler yapılmıştır. DNA izolasyonu aşağıda belirtilen DNA izolasyon protokolünün modifiye edilmesi ile yapılmıştır.

1. Liofilizatörden çıkarılan örnekler öğütülmüştür.
2. Öğütülen örnekler yaklaşık 40-50 ml olacak şekilde ependorf tüplere alınmıştır.
3. 500 µl CTAB buffer ve mercaptoethanol eklenerek hafif bir karıştırma işlemine tabi tutulmuştur.
4. 65 °C'de 1 saat su banyosunda örnekler bekletilmiştir.

5. Su banyosunda çıkarılan örnekler 24:1 oranında 500 ml kloroform izoamil alkol eklenmiştir.
6. Örnekler 13.500 devire ayarlanan santrifüjde 30 dakika santrifüj edilmiştir.
7. Daha sonra ependorf tüpler içerisindeki örneklerin üst fazı yaklaşık 500 μ l alınmıştır.
8. 28 μ l amonyum asetat (soğuk) eklenmiştir.
9. 204 μ l isoproponal (soğuk) eklenerek hafif bir karıştırma işlemine tabi tutulmuştur.
10. -20 °C’de 24 saat bekletilmiştir.
11. -20 °C’de soğutucudan çıkarılan örnekler 5 dakika santrifüj edilmiştir.
12. Üst faz boşaltılarak peletin ortaya çıkması sağlanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Pelet görüntüsü.

13. Peletlerin içine %70 oranında bulunan 700 μ l soğuk ethanol eklenerek 3dakika santrifüj edilmiştir.
14. Santrifüjden sonra ethanol dökülerek üzerine tekrar % 90 oranında 700 μ l ethanol eklenmiş. 3 dakika santrifüj edilmiştir.

15. Santrifüjden çıkarılan örnekler tekrar boşaltılarak kalan etanolunda kuruması için yaklaşık 55 °C’de 20 dakika bekletilmiştir.

16. Örnek tüplere 100 µl saf su eklenerek -20 °C’de bekletilmiştir.

3.2.3. PCR analizleri

PCR, yapay ortamda DNA polimeraz enziminin kullanmasıyla DNA’nın çoğaltılmasını ifade eder. DNA üretimi için belli sayıda başlatıcı markörlerin kullanılması gerekir. Bu markörler ile tampon bir çözelti hazırlanmıştır. Reaksiyon ortamı için gereken kalıp DNA, DNA’ya yapışacak sentetik markörler, DNA’nın çoğalması için gerekli olan enzim olan taq polimeraz, taq polimerazın kofaktörü olan MgCl₂, ddH₂O eklenmesiyle PCR ürünü hazırlanmıştır. Polimeraz enzimi başlatıcı markörlerin (DNA) istediğimiz bir kalıp DNA’nın aynısını üretir. DNA çoğaltım işlemi PCR’ da spesifik sıcaklıklar ile bir çok döngünün gerçekleşmesiyle gerçekleşmektedir. PCR reaksiyonunda, ilk aşamada çift zincirli DNA’nın tek zincirli hale gelmesini sağlayan denatürasyon işlemi gerçekleşir. Daha sonraki bağlanma aşamasında markörün istediği sıcaklığa göre ayarlanarak markör kalıp DNA’ ya bağlanmaktadır. Son olarak uzama aşamasıdır ve bu aşamada polimeraz markörden başlayarak yeni zinciri kalıp zincire göre uzatır bunun sonunda bir DNA parçasından bir döngü sonucunda iki DNA parçası elde edilmektedir. Genelde bu son aşamanın en iyi çalıştığı uygun değer sıcaklık 72 °C’dir. Bu üç devre çalışmamızdaki markörlerin istediği sıcaklık değerlerine göre PCR döngüleri ayarlanmıştır (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. Markörlerin annealing sıcaklığı

Markör	Annealing	Kaynak
Sw5b-IRR	56 °C	Garland ve ark., 2005
CT220	56 °C	Garland ve ark., 2005
Scr-001	65 °C	Rosello ve ark., 2001
SCAR-421	56 °C	Mikel Stevens Pers. Comm
P7-43B	53 °C	Barillas ve ark., 2008
PTG-190	53 °C	Barillas ve ark., 2008
P743DF1	53 °C	Barillas ve ark., 2008
P743DF3	53 °C	Barillas ve ark., 2008
At2	54 °C	Scott ve ark., 2004
TAO1	62 °C	Staniaszek ve ark., 2007
P6-25	53 °C	Ji ve ark., 2008
JB-1	55 °C	Castro ve ark., 2007
Mi23	57 °C	Seah ve ark., 2007
Pmi	55 °C	Arens ve ark., 2010
TG-180	35 °C	Yaghoobi ve ark., 2005
TG-263	35 °C	Yaghoobi ve ark., 2005
Aps	55 °C	Ammiraju ve ark., 2003
C8B	58 °C	Ammiraju ve ark., 2003
VVF2	55 °C	Kuklev ve ark., 2008
Ve1YP-F	60 °C	Park ve ark., 2008
Tomv	55 °C	Dax et al. 1998

3.2.4. Jel görüntüleme

PCR ürünlerinin görüntülenmesini iki elektroforez sisteminden faydalanmıştır. Bunlardan birisi Thermo Scientific marka olan, agarozun içinde çözülebilecek bir solüsyon hazırlayarak belli bir sıcaklıkta jel haline geldikten sonra içinde taraklar bulunan elektroforezin içine dökülerek bir süre bekledikten sonra PCR ürünlerini

yükleyerek yapılan agaroz jel elektroforezi diğeri ise Qiaxcell screen software isimli kapillar cihazına PCR ürününü yerleştirilerek görüntülemesi yapılan cihazdır.

Bu çalışmada örneklerimiz % 2'lik agaroz jele yüklenmiştir. Bununla birlikte agaroz jelde istenen ölçüde açılım bulunmadığında agaroz jel yoğunluğu % 2,5-3 olarak ayarlanmıştır ve ortalama 3 saat 80-120V arası elektrik akımı uygulanmıştır. Daha sonra UV ışınlar altında bant görüntülemesi yapılmıştır.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Domates solgunluk virüsü için CAPS SW5b-IRR, CT220 ve SCAR SCR-001, SCAR421 markörlerinin 24 domates genotipi üzerinde analizi yapılmıştır. Bu markörlerden SCR-001 için görüntü alabilirken, SW5b-IRR, CT220 ve SCAR421 için herhangi bir görüntü alınamamıştır.

Fusarium solgunluğuna ait P7-43BF1, PTG-190, TAO1 CAPS markörleri ve P743DF3-P743DR3, P743DF1-P743DR1, At2-F3-At2-R3 SCAR markörlerini belirttiğimiz 24 domates genotipi üzerinde analizi yapılmıştır. P7-43BF1 marköründen sonuç alınamamıştır. Bununla birlikte PTG-190, TAO1 ve P743DF3-P743DR3, P743DF1-P743DR1, At2-F3- At2-R3 markörlerinin hepsi için görüntü alınmıştır.

Domates yaprak kıvrıcıklığı virüsü için geliştirilmiş olan SCAR P6-25 ve CAPS JB-1 markörlerini 24 domates genotipi üzerinde yapılan analizler sonucunda P6-25 için sonuç alabilirken, JB-1 için görüntü alınamamıştır.

Kök-ur nematodu için kullanılan SCAR Mi-23 ve PMİ markörleri 24 domates genotipi üzerinde analizi yapıldıktan sonra görüntü alınmıştır. Fakat SCAR TG-180 ve TG-263 markörleri ve CAPS, APS ve C8B markörleri için görüntü alınamamıştır.

Verticillium solgunluğuna ait CAPS VVF2 ve Ve1YP markörleri 24 domates genotipi üzerinde test ettikten sonra herhangi bir sonuç alınamamıştır.

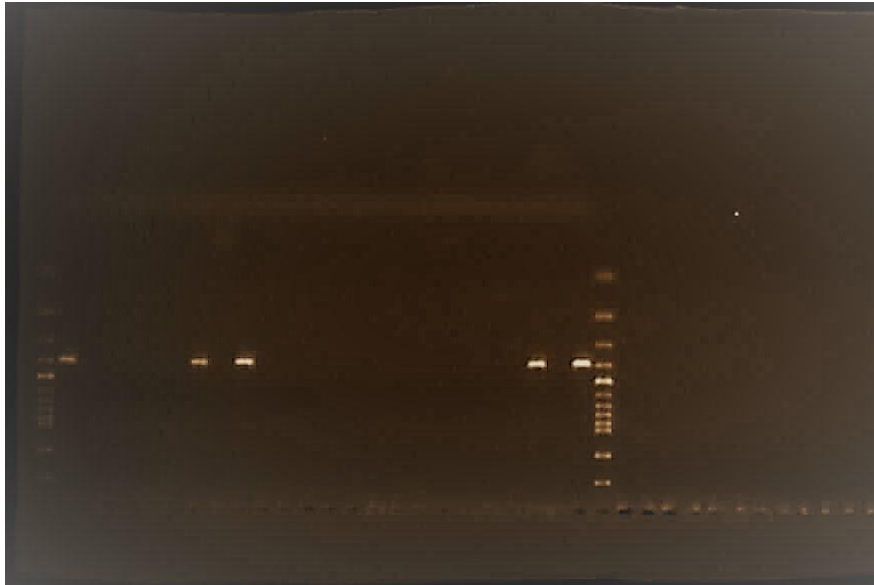
Domates mozaik virüsü için Tomv markörünü kullanılmıştır. Bu markör 24 domates genotipi üzerinde test edilmiştir ve görüntü alınabilmiştir.

4.1. Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV)'ne ait markörlerin PCR analiz sonuçları

Bu çalışmada domates lekeli solgunluk virüsü' ne dayanıklılık için geliştirilmiş olan SW5b-IRR, CT220, SCR-001, SCAR421 markörleri 9 F₁, 12 yerli çeşit ve Mountain Merit, NC123S, NC1CELBR çeşitleri olmak üzere 24 domates genotipi taraması yapılmıştır. Sadece SCR-001 markör çifti sonuç vermiştir.

4.1.1. Scr-001 markörü

Domateste domates lekeli solgunluk virüsüne dayanıklılık sağlayan *L. peruvianum*'dan aktarılan sw-5 genine dayanan markörler dizayn edilmiş ve ıslah çalışmalarında kullanılmıştır. Bu çalışmada sw-5 genine dayalı olarak geliştirilen Scr-001F/R markör çifti 24 domates genotipi üzerinde taranmıştır (Şekil 4.1-Çizelge 4.1). Bu dominant markörün dayanıklılık bandı 400bp'de görüntü vermektedir. 9 F₁ ticari çeşidin 3'ünde 400bp'lik dayanıklı bant elde edilmiş ve 6'sında herhangi bir bant elde edilememiştir. Yerli çeşitlerin 12 tanesinde herhangi bir dayanıklılık bandı elde edilememiştir. Kontrol grubunda ise Mountain Merit ve NC123S homozigot dayanıklılık bandı elde edilmiştir. Rosella ve ark. (2001) yaptığı, *Lycopersicon peruvianum*'dan aktarılan domateste bakteriyel solgunluk direnci olan UPV-1 ıslah hattında Sw-5 alleli kontrol eden ve hibrit yetiştiriciliğinde dayanıklılığı arttırabilmek için yaptıkları çalışmada Sw-5 ile bağlantılı SCAR Scr001F/R dominant markör çifti kullanılmış. Analizlerin görüntülenmesinin sonucunda 400bp baz uzunluğunda sonuç vermiştir. Sw-5'te çalışan SCAR markırı UPV-1 de benzer şekilde çalışmış ve ticari hibrit çeşitlerinin geliştirilmesinde UPV-1'in önemli olduğunu göstermişlerdir (Rosella ve ark., 2001).



Şekil 4.1 Scr-001 dominant markörü ile elde edilen 400bp bant.

Çizelge 4.1. Scr-001 markör sonuçları

GENOTİP	TSWV'ye DAYANIKLILIK (SW-5 GENİ) MARKÖR MEVCUDİYETİ (400bp)
1. Alkan F1	+ *
2. Olgun F1	-
3. Servet F1	-
4. Çiko F1	-
5. Alsancak F1	+
6. Merkür F1	-
7. Marmara F1	+
8. Nergis F1	-
9. Cazibe F1	-
10. Erzurum sırk	-
11. Van sırk	-
12. Siirt yerli1	-
13. Siirt yerli 2	-
14. Gönen	-
15. Sencan sırk	-
16. Köylüm	-
17. Armut	-
18. Yayla	-
19. Sırk kapıdağ	-
20. Oturak geleneksel	-
21. Patika	-
22. Mountain merit	+
23. NCICELBR	-
24. NC123S	+

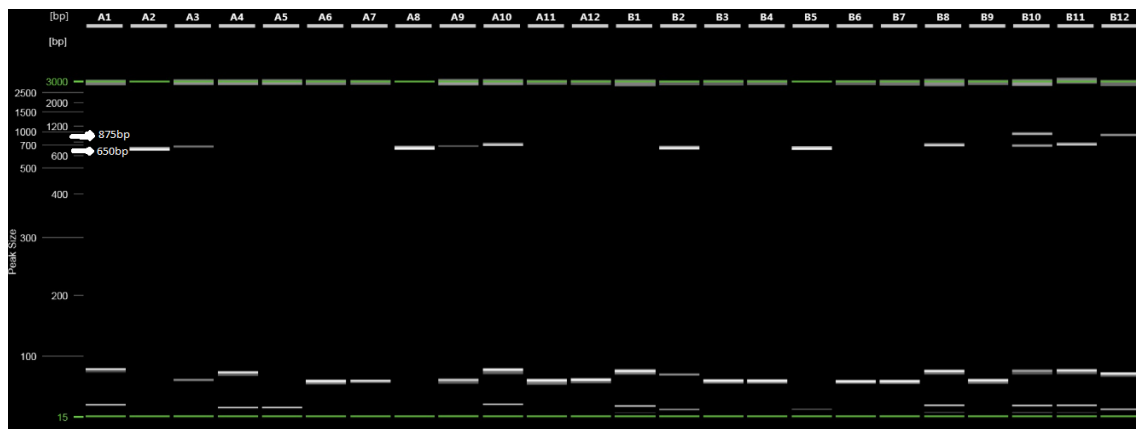
*: (+): bant mevcut * :(-): bant mevcut değil

4.2. Fusarium solgunluğuna (FOL) ait markörlerin PCR analiz sonuçları

Fusarium solgunluğuna ait P7-43BF, PTG-190, TAO1 CAPS markörleri ve P743DF3-P743DR3, P743DF1-P743DR1, At2-F3- At2-R3 SCAR markörleri ile 9 F₁, 12 yerli çeşit ve Mountain Merit, NC123S, NC1CELBR çeşitleri olmak üzere 24 domates genotipinde taraması yapılmıştır. P7-43BF haricindeki belirtilen markörlerden sonuç alınabilmektedir.

4.2.1. 43DF3-43DR3 markör analiz sonuçları

Fusarium oxysporum f.sp. *lycopersici* ırkı-3'e bağlı olarak geliştirilmiş olan SCAR 43DF3-43DR3 markörü 24 domates genotipinden analiz edilmiştir (Şekil 4.2 ve Çizelge 4.2). F₁ ticari çeşitlerin 4'ünde 650bç duyarlı bant elde edilmiştir. Yerli çeşitlerin de 4'ünde duyarlı bant elde edilmiştir. Kontrol grubunda ise Mountain merit 650bç ve 875bç'de bant vererek bu çeşidin heterozigot olduğu tespit edilmiştir. NC1CELBR çeşidi 650bç de bant vermiş duyarlı genotip olduğu görülmüştür. NC123S ise 875bç baz uzunluğu vererek dayanıklı özellik göstermiştir. Barillas ve ark. (2008), I-3 dayanıklılık genine bağlı olarak geliştirilmiş olan SCAR 43DF3/R3 belirtecini farklı domates genotipleri üzerinde test etmişlerdir. Duyarlı bantlar 650bç aralığında ve dayanıklı bantlar 875bç aralığında elde edilmiştir. Bunun sonucunda I-3 geniyle SCAR 43DF3/R3 ko-dominant belirtecinin bağlantılı olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. 43DF3 markörü PCR ürünlerinin Kapillar elektroforez görüntüsü(100bç kullanılmıştır (R:875bç, S: 650bç).

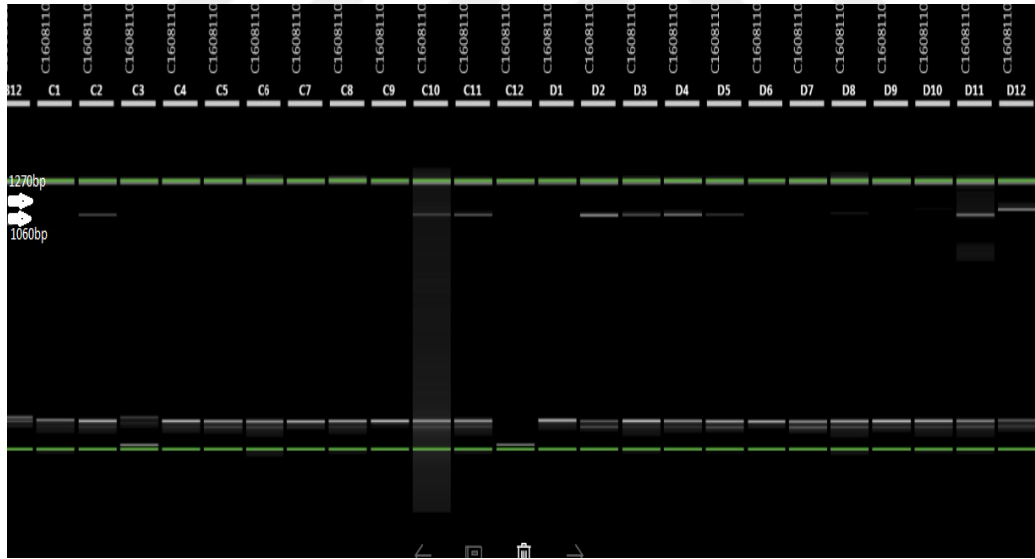
Çizelge 4.2. 43DF3-43DR3 markörüne ait sonuç

GENOTİP	FOL DAYANIKLILIK (I-3 GENİ) MARKÖRÜ MEVCUDİYETİ
1. Alkan F1	-
2. Olgun F1	S*
3. Servet F1	S
4. Çiko F1	-
5. Alsancak F1	-
6. Merkür F1	-
7. Marmara F1	-
8. Nergis F1	S
9. Cazibe F1	S
10. Erzurum sırık	S
11. Van sırık	-
12. Siirt yerli1	-
13. Siirt yerli 2	-
14. Gönen	S
15. Sencan sırık	-
16. Köylüm	-
17. Armut	S
18. Yayla	-
19. Sırık kapıdağ	-
20. Oturak geleneksel	S
21. Patika	-
22. Mountain merit	H*
23. NCICELBR	S
24. NC123S	R*

*: H: heterozigot dayanıklı; R: homozigot dayanıklı; S: homozigot duyarlı

4.2.2. 43DF1-43DR1 markör analiz sonuçları

Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici ırkı-3'e bağlı olarak geliştirilmiş olan 43DF1-43DR1 markörü 24 domates genotipi üzerinde test edilmiştir (Şekil 4.3 ve Çizelge 4.3). F₁ ticari çeşitlerin 9 genotipin 1'inde 1060bç de baz uzunluğu veren duyarlı bant elde edilmiştir. Yerli çeşitlerin 6'nda ise duyarlı bant vermiştir. Kontrol grubunun NC123S te 1270bç de dayanıklı bant elde edilmiştir. Mountain Merit'te hiç bant elde edilmezken NCICELBR 'de duyarlı bandı elde edilmiştir. Barillas ve ark. (2008)'nın yaptığı çalışmada 43DF1-43DR1 markörü; domates genotipleri üzerinde test edilmiş ve SCAR 43DF1\R1 markör çifti duyarlı genotiplerde 1060bç'de dayanıklı genotiplerde 1270bç' de bant elde edilmiştir. Bu denemenin sonucunda I-3 geniyle SCAR 43DF1/R1 ko-dominant markörünün bağlantılı olduğu değerlendirilmiştir ve domates hatlarında markör destekli seleksiyon kullanılabileceği belirtilmiştir (Barillas ve ark 2008).



Şekil 4.3. 43DF1-43DR1 markörü PCR ürünlerinin Kapillar elektroforez görüntüsü(R:1060bç, S: 1270bç)

Çizelge 4.3. 43DF1-43DR1 markörüne ait sonuç

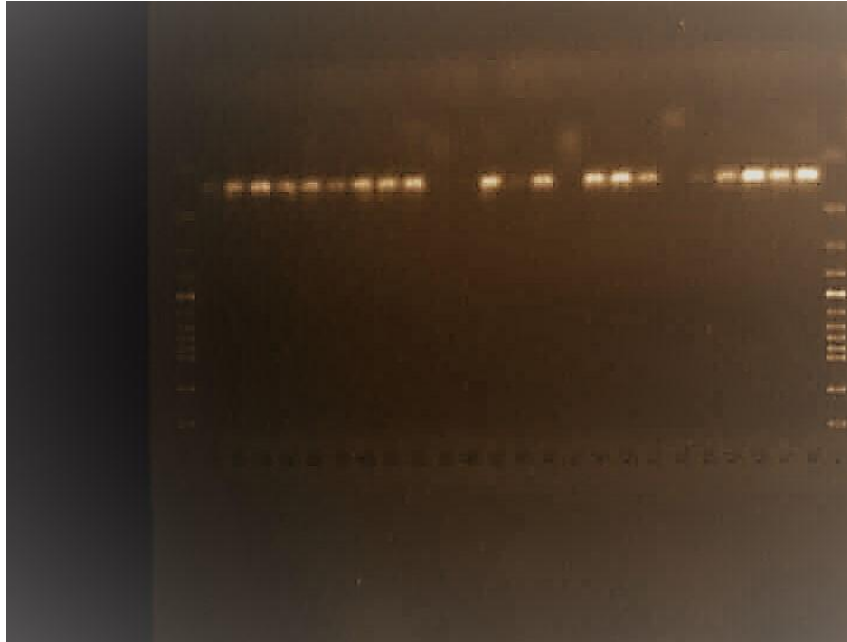
GENOTİP	FOL DAYANIKLILIK (1-3 GENİ) MARKÖRÜ MEVCUDİYETİ
1. Alkan F1	-
2. Olgun F1	S*
3. Servet F1	-
4. Çiko F1	-
5. Alsancak F1	-
6. Merkür F1	-
7. Marmara F1	-
8. Nergis F1	-
9. Cazibe F1	-
10. Erzurum sırık	S
11. Van sırık	S
12. Siirt yerli1	-
13. Siirt yerli 2	-
14. Gönen	S
15. Sencan sırık	S
16. Köylüm	S
17. Armut	S
18. Yayla	-
19. Sırık kapıdağ	-
20. Oturak geleneksel	-
21. Patika	-
22. Mountain merit	-
23. NCICELBR	S
24. NC123S	R*

*: H: heterozigot dayanıklı; R: homozigot dayanıklı; S: homozigot duyarlı

4.2.3. AT-2 markörüne ait analiz sonuçları

Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici ırkı-1'e bağlı olarak geliştirilmiş olan At-2F/R markörü 24 domates genotipi üzerinde taraması yapılmıştır. 9 ticari çeşidin 8 adedinde 130bç dayanıklı bant elde edilirken sadece 1 adedinde bant görülmemiştir. Yerli çeşitlerin 7'sinde dayanıklı bant elde edilmiştir. Kontrol grubunun NCICELBR ve NC123S çeşitleri dayanıklılık bandını verirken Mountain Merit'te herhangi bir bant elde edilememiştir.

Arens ve ark. (2007) yaptığı çalışmada domates çeşitlerinde I-1 genine bağlı dayanımı test etmek için At-2 markörünü kullanmıştır. Bu belirtecin I-1 gen lokusunun varlığını tespit etmek için kullanılabileceğini ifade etmiştir (Arens ve ark., 2007). Pınar ve ark. (2013) yaptığı çalışmada 450 adet domates çeşidinde I-1 ve I-2 genlerine bağlı dizayn edilen SCAR ve CAPS markörleri ile analiz yapılmıştır. I-1 genine bağlı olarak geliştirilmiş olan At-2F/R markörü ile tarama yapılmasının sonucunda 450 adet domates genotiplerinde 88 adedinde 130bç 'de dayanıklı bant vermiştir. Bunun sonucunda *Fusarium oxysporum f.sp.* ye dayanıklılığın belirlenmesinde yol gösterici olabileceği belirtilmiştir (Pınar ve ark., 2013).



Şekil 4.4. At-2 markörüne ait dominant markörü ile elde edilen 130bç bant.

Çizelge 4.4. 4 At-2 markörüne ait PCR analizi sonuçları

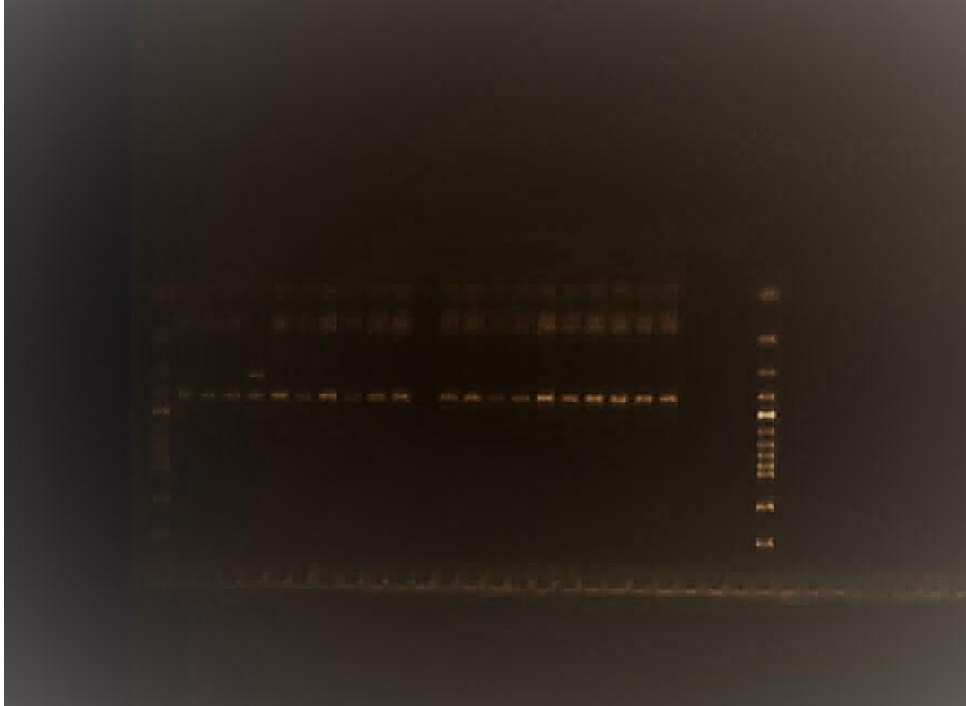
GENOTİP	FOL DAYANIKLILIK (I-1 GENİ) MARKÖRÜ MEVCUDİYETİ
1. Alkan F1	+
2. Olgun F1	+
3. Servet F1	+
4. Çiko F1	+
5. Alsancak F1	+
6. Merkür F1	+
7. Marmara F1	-
8. Nergis F1	+
9. Cazibe F1	+
10. Erzurum sırık	-
11. Van sırık	-
12. Siirt yerli1	+
13. Siirt yerli 2	+
14. Gönen	-
15. Sencan sırık	+
16. Köylüm	+
17. Armut	+
18. Yayla	+
19. Sırık kapıdağ	-
20. Oturak geleneksel	-
21. Patika	+
22. Mountain merit	-
23. NCICELBR	+
24. NC123S	+

*: (+): bant mevcut * :(-): bant mevcut değil

4.2.4. Ptg-190 markörü analiz sonuçları

Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici ırkı-3'e bağlı olarak geliştirilmiş olan Ptg-190 markörü 24 domates genotipi üzerinde test edilmiştir. Ptg-190 markörü (Şekil 4.5.) AluI kesme enzimiyle kesilmiştir. Bu işlemin sonunda 24 domates genotipinden sadece ticari çeşitten 1 adedinde kesme işlemi gerçekleşmiş fakat bant aralığı tespit edilememiştir. Diğer genotiplerde bu belirteç sağlıklı sonuç vermemiştir.

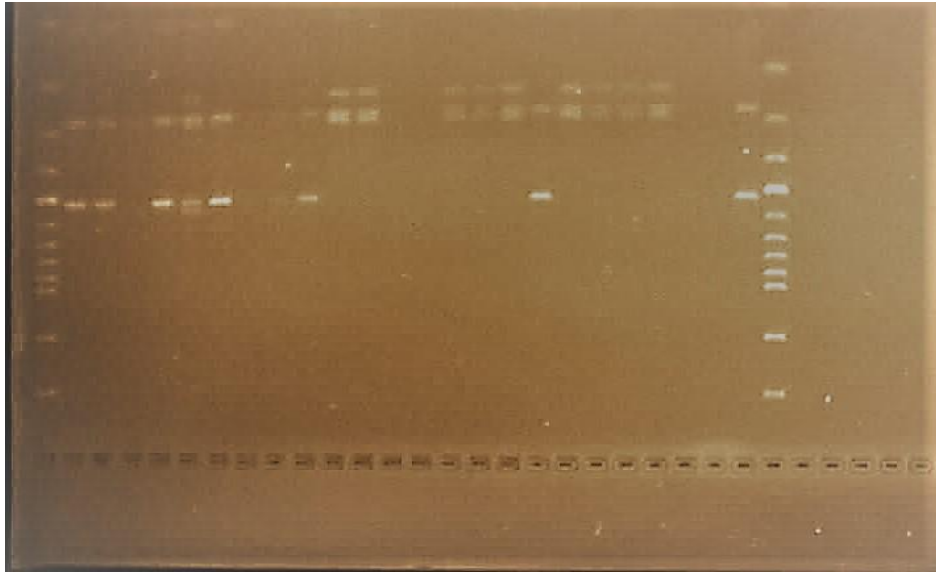
Barillas ve ark. (2008) yaptığı çalışmada *S. penelli* kaynaklı fol 3 ırkına dayanıklılık sağlayan I-3 genine yönelik CAPS belirteci çalışılmış ve Ptg -190 markör çifti DNA AluI enzimiyle kesilmesi sonucu dayanıklı bant olarak 400bç bandı, 249bç, 90bç, 60bç ve duyarlıda 401bç, 165bç, 143bç ve 90bç belirlenmiştir. 249bç bandı dayanıklı belirteçler ise 165bç ise hassas genotipler için belirleyici olduğu bildirilmektedir (Barillas ve ark. 2008).



Şekil 4.5. Ptg-190 markörü ile elde dayanıklı (400, 249, 90, 60bç) ve duyarlı (401, 165, 143, 90bç) bant varlığı.

4.2.5. TAO1 markörüne ait analiz sonuçları

Fusarium oxysporum f.sp. *lycopersici* ırkı-2'ye bağlı olarak geliştirilmiş olan CAPS TAO1 ko-dominant markörünün 24 domates genotipi üzerinde taraması yapılmıştır. Bu markör RsaI kesme enzimiyle kesilmesi sonucu bantlar elde edilmiştir. 24 domates genotipinden sekizinde hem 250bp de hem de 500bp de bant aralığı vermiştir. Ticari F₁ çeşitlerin 9 adedinin altısında 250bp ve 500bp her iki baz uzunluğunu vererek heterozigot özellik olduğunu göstermektedir. Yerel çeşitlerin 9 adedinde sadece 250bp'de bant tespit edilmesiyle homozigot duyarlı özellik göstermiştir. Kontrol grubunun NC123S çeşidinde her iki bantta elde edilerek H (heterozigot) özellik gösterdiği gözlemlenirken, Mountain Merit ve NCICELBR de bant elde edilememiştir. Pınar ve ark. (2013) yaptığı çalışmada belirtilen Tao CAPS markörü test edildikten sonra 92 adet domates hattından 20 adet dayanıklı, 25 adet duyarlı ve 47 adedinde hem duyarlı hem hassas (heterozigot) bant elde edilmiştir. Tao CAPS markörünün FOL' a karşı klasik testlemeye göre dayanıklı hat ve çeşit geliştirmede kolaylık sağlayabileceği belirtilmiştir (Pınar ve ark. 2013).



Şekil 4.6. TAO1 markörüne ait markörü ile elde edilen S:250bp R:500 bant.

Çizelge 4.6. TAO1 markörüne ait PCR analizi sonuçları

GENOTİP	FOL DAYANIKLILIK (I-2 GENİ) MARKÖRÜ MEVCUDİYETİ
1. Alkan F1	H*
2. Olgun F1	H
3. Servet F1	-
4. Çiko F1	H
5. Alsancak F1	H
6. Merkür F1	H
7. Marmara F1	H
8. Nergis F1	-
9. Cazibe F1	-
10. Erzurum sırık	S*
11. Van sırık	S
12. Siirt yerli1	-
13. Siirt yerli 2	-
14. Gönen	S
15. Sencan sırık	S
16. Köylüm	S
17. Armut	H
18. Yayla	S
19. Sırık kapıdağ	S
20. Oturak geleneksel	S
21. Patika	S
22. Mountain merit	-
23. NCICELBR	-
24. NC123S	H

*: H: heterozigot dayanıklı; R: homozigot dayanıklı; *S: homozigot duyarlı

4.3. Domates sarı yaprak kıvrıcıklığı virüsüne (TYLCV) ait markörlerin PCR analiz sonuçları

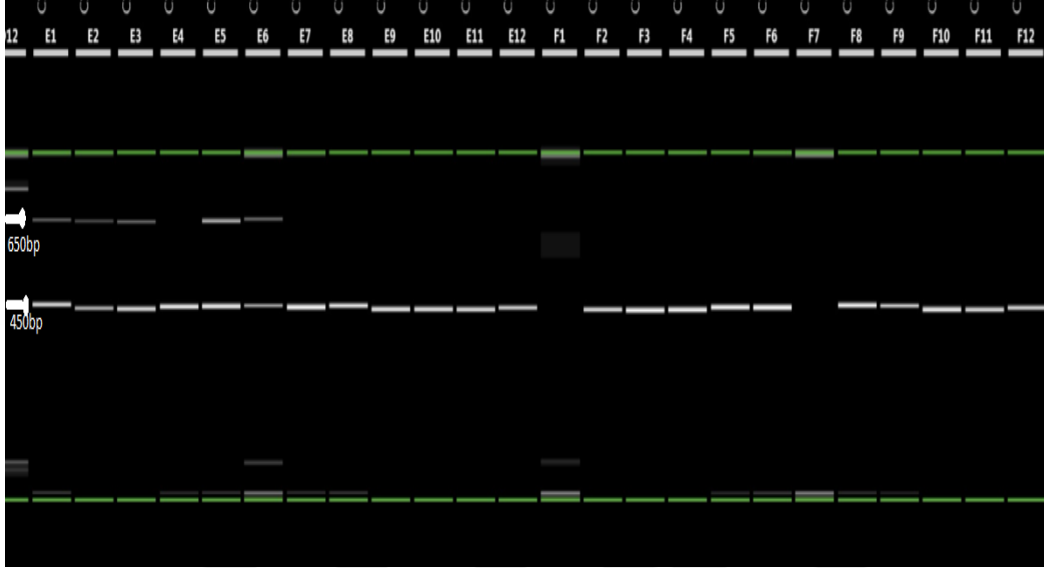
Domates sarı yaprak kıvrıcıklığı virüsüne ait Ty-3 dayanıklılık genine bağlı olarak geliştirilmiş olan SCAR P6-25 ko-dominant markörü kullanılmıştır. 24 domates genotipi üzerinde taranmıştır. Ayrıca Ty-1 dayanıklılık genine bağlı olarak geliştirilen CAPS JB-1 ko-dominant markörü 24 domates genotipinde üzerinde çalışılmış, fakat sonuç vermemiştir.

4.3.1. P6-25 Markörüne ait analiz sonuçları

Domates sarı yaprak kıvrıcıklığına dayanıklılık geni olan ty-3 genine ait tasarlanmış olan P6-25 ko-dominant markörü 24 domates genotipi üzerinde taranmıştır (Şekil 4.7-Çizelge 4.7). Dokuz ticari F₁ hibrit çeşitten 5 tanesinde hem 450bp duyarlı bandı hem de 650 dayanıklı bandı elde edilerek heterozigot durum tespit edilmiştir. Bu F₁ çeşitlerin 4 adedinde 450bp duyarlı bant elde edilmiştir. Yerli çeşitlerin 10 tanesinde duyarlı bant elde edilirken 2'sinde herhangi bir bant elde edilememiştir. Kontrol grubunun olan Mountain Merit, NCICELBR, NC123S 450bp'de duyarlı bant olduğu tespit edilmiştir. Pınar ve ark. (2013) yaptığı çalışmada Ty-3 dayanıklılık geni için P6-25 markörünün test edilmesinden sonra 92 adet domates genotipin 24 'ünde homozigot dayanıklı bant ve 18'inde duyarlı bant elde edilirken, 50 adedinde her iki bant elde edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda anlaşılmaktadır ki belirtilen hastalığa karşı moleküler belirteçler klasik testlemeye göre dayanıklı hat ve çeşit geliştirmede kolaylık sağlayabileceğini belirtmişlerdir. (Pınar ve ark., 2013).

Prasanna ve ark.(2015)'nın yaptığı çalışmada Ty-3 geniyle bağlantılı SCAR P6-25 markörü kullanılmıştır. Gc4 ve Gc171 hatlarda Ty-3 ile ilişkili olanlar duyarlı çeşitlerde 450bp dayanıklı çeşitlerde 650bp bir uzunluk oluşturmuştur. Ty-1 geniyle bağlantılı C2-At5g6151 marköründe 1000bp bir bant teşhisi güçlendirilmiştir. P6-25 ve C2-At5g61510'un birleştirilmesiyle oluşturulan analizlerde, LA3473, CA4 ve GC171'deki Ty-1 / Ty-3 genini ayırt etmiştir. SCAR P6-25 markörü ve C2-At5g61510 birlikte kullanıldığı takdirde başarılı sonuç vermiştir. Bu çalışmada geliştirilen domates

hatları domates yaprak kıvrıcıklığı virüsünden etkilenen bölgelerde yetiştiricilik yapılan domates alanlarında önemli genetik kaynak olabileceği belirtilmiştir (Prasanna ve ark., 2015).



Şekil 4.7. P6-25 markörü PCR ürünlerinin Kapillar elektroforez görüntüsü R:650bç, S: 450bç).

Çizelge 4.7. P6-25 markörüne ait PCR analizi sonuçları

GENOTİP	TYLCV DAYANIKLILIK (TY-3 GENİ) MARKÖRÜ MEVCUDİYETİ
1. Alkan F1	H*
2. Olgun F1	H
3. Servet F1	H
4. Çiko F1	S*
5. Alsancak F1	H
6. Merkür F1	H
7. Marmara F1	S
8. Nergis F1	S
9. Cazibe F1	S
10. Erzurum sırık	S
11. Van sırık	S
12. Siirt yerli1	S
13. Siirt yerli 2	-
14. Gönen	S
15. Sencan sırık	S
16. Köylüm	S
17. Armut	S
18. Yayla	S
19. Sırık kapıdağ	-
20. Oturak geleneksel	S
21. Patika	S
22. Mountain merit	S
23. NCICELBR	S
24. NC123S	S

*: H: heterozigot dayanıklı; R: homozigot dayanıklı; S: homozigot duyarlı

4.4. Nematoda (RKN) ait markörlerin PCR analiz sonuçları

Kök-ur nematoduna ait Mi-1 dayanıklılık genine ait SCAR ko-dominant Mi-23 ve PMİ markörleri, Mi-3 dayanıklılık geni için SCAR ko-dominant TG-180 ve TG-263 markörleri ve Mi dayanıklılık geni içinde CAPS ko-dominant APS ve C8B markörleri 24 domates genotipi üzerinde taraması yapılmıştır. Sonuç alınan Mi-23 markörüne ait markör sonuçları aşağıda sunulmuştur.

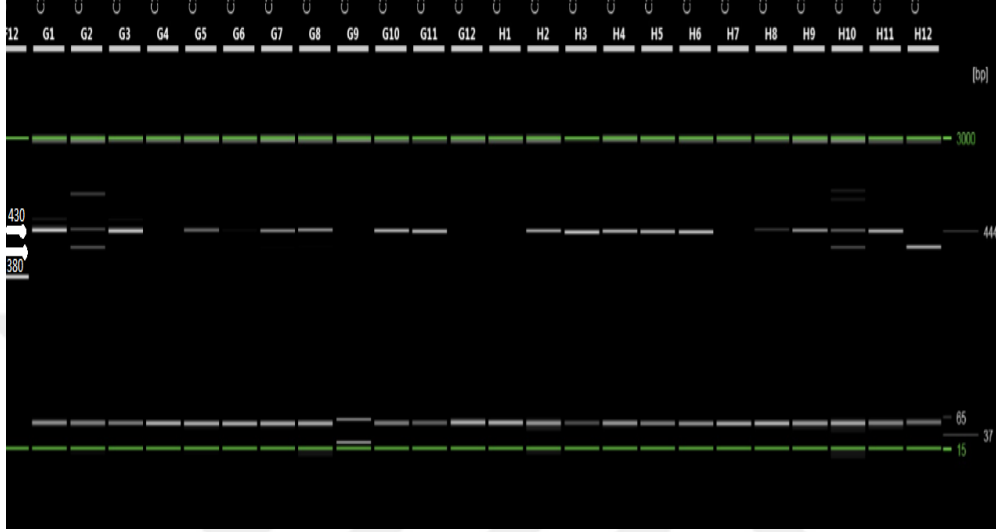
4.4.1. Mi-23 markörüne ait analiz sonuçları

Solanum habrochaite'den aktarılan Mi-1 genine dayalı olarak geliştirilmiş olan SCAR ko-dominant Mi-23 markörü 24 domates genotipi üzerinde analizi yapılmıştır (Şekil 4.8-4.9, Çizelge 4.8). Bunlardan 9 ticari F₁ çeşitten 5 adedi 430bç' de dayanıklı bant elde edilmiştir. Bir ticari 380bç duyarlı ve 430bç dayanıklılık bandı elde edilerek heterozigot özellik göstermiştir. Yerli çeşitleri 9'unda dayanıklılık bandı elde edilmiş. Kontrol grubundan Mountain merit heterozigot (H), NCICELBR duyarlı (S), NCI123S (R) dayanıklı bant elde edilmiştir.

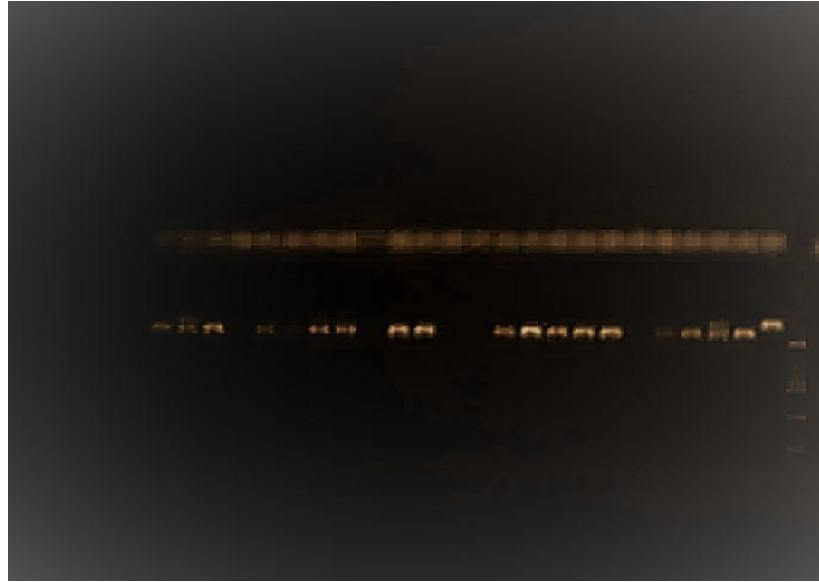
Özaslan ve ark. (2010) yaptığı çalışmada domateste kök-ur nematoduna dayanıklılık sağlayan Mi1-2 geninin Mi23 SCAR markörü ile belirlenmesi için yapılan bu çalışmada 18 adet domates genotipinin kök-ur nematodu dayanıklılık durumları ve dayanıklılık çeşitleri (homozigot, heterozigot) moleküler markör yöntemiyle araştırmışlardır. Ortaya çıkan bantlarda 430bç tek bant veren duyarlı, 380bç tek bant veren dayanıklı her iki bant elde edilmesinde durumunda heterozigot dayanıklı bireyler elde edilmiştir. 18 domates hattından 1 adet homozigot dayanıklı, 4 adedinde duyarlı bant ve diğer 13 domates genotipte heterozigot dayanıklı bant elde edilmiştir. SCAR Mi23 ile duyarlı ve dayanıklı bitkilerde herhangi bir enzim kullanmadan duyarlı, heterozigot ve homozigot dayanıklı bireyleri rahatlıkla ayrılabilmiştir (Özaslan ve ark., 2010).

Danso ve ark. (2011) yaptığı çalışmada bazı domates genotipleri üzerinde kök-ur nematodunun dayanıklılık geni olan Mi/1-2 gen lokusunu tespit etmek için Mi23F/R markör çifti kullanılarak 28 domates genotiplerinde moleküler analiz yapılmıştır. Bu genotiplerin 6'sında duyarlı genotipi tespit edilen 380 baz uzunluk elde edilmiştir. Altı dayanıklı genotipte 430bç bant uzunluğunda ve 5 heterozigot yani her iki bant aralığı

elde edilmiştir. Bu çalışmanın sonunda kök-ur nematoduna karşı dayanıklı domates genotipleri için Mi genine özgün belirtecin kullanımının güvenilir, zamanında ve etkili bir tarama olduğunu açıkça göstermiştir (Danso ve ark 2011).



Şekil 4.8. Mİ23 markörü PCR ürünlerinin Kapillar elektroforez görüntüsü (R:430bç, S: 380bç).



Şekil 4.9. Mi-23 markörüne ait elektroforez jel görüntüsü (R: 430bç S:380bç).

Çizelge 4.8. Mi-23 markör sonucu

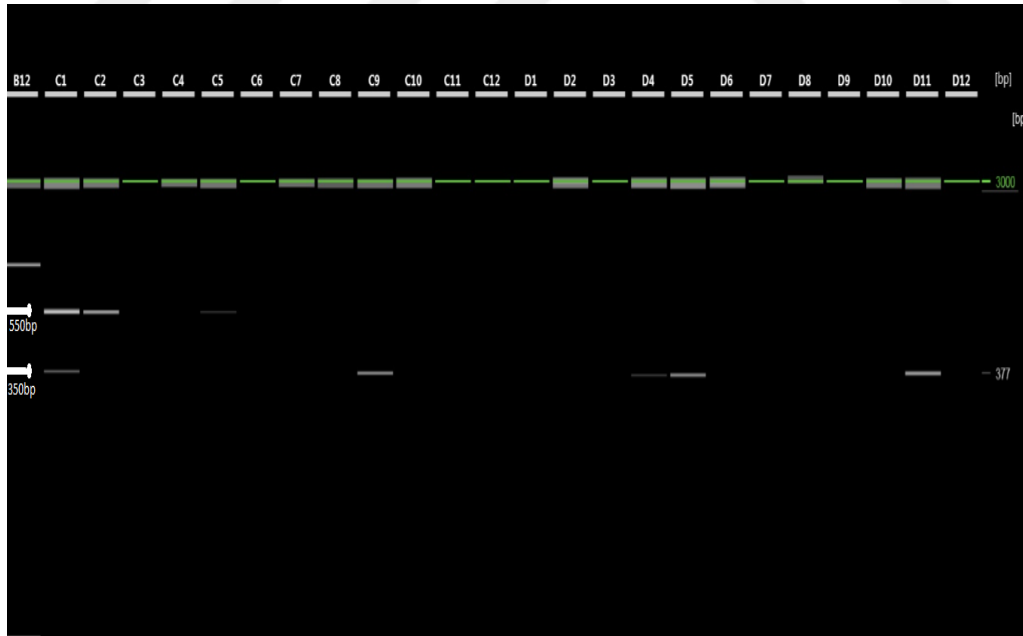
GENOTİP	KÖK-UR NEMATODU (Mİ-1 GENİ) MARKÖRÜ MEVCUDİYETİ
1. Alkan F1	R*
2. Olgun F1	H*
3. Servet F1	R
4. Çiko F1	-
5. Alsancak F1	R
6. Merkür F1	-
7. Marmara F1	R
8. Nergis F1	R
9. Cazibe F1	-
10. Erzurum sırık	R
11. Van sırık	R
12. Siirt yerli1	-
13. Siirt yerli 2	-
14. Gönen	R
15. Sencan sırık	R
16. Köylüm	R
17. Armut	R
18. Yayla	R
19. Sırık kapıdağ	-
20. Oturak geleneksel	R
21. Patika	R
22. Mountain merit	H
23. NCICELBR	S*
24. NC123S	R

: H: heterozigot dayanıklı; R: homozigot dayanıklı;* S: homozigot duyarlı

4.4.2. PMİ markörüne ait analiz sonuçları

S. peruvianum'dan aktarılan Mi lokusundaki Mi1-2 dayanıklılık geni için geliştirilmiş markörlerden bir diğeri olan PMİ markörü 24 domates genotipi üzerinde analizi yapılmıştır (Şekil 4.10-Çizelge 4.9). 9 ticari çeşitten 2 tanesinden 350bç duyarlılık bandı elde edilmiştir. Bir tanesinde 550bç dayanıklılık bandı elde edilirken, bir tanesinde ise her iki bantta görülmüş ve heterozigot olduğu tespit edilmiştir. Yerli çeşitlerde ise sadece 2 adet duyarlı bandı elde edilmiştir. Kontrol grubunun da NCICELBR'de duyarlılık bandı elde edilirken diğer 2 çeşitte herhangi bir bant elde edilememiştir.

El Mehrac ve ark. (2005) yaptığı çalışmada Mi1-2 bölgesi için dört markör belirlenmiştir. Bunlardan biri olan Pmi markörü PCR' a dayalı olarak anonim olarak seçilen domates genotiplerinde denendikten sonra duyarlı 350, dayanıklı 550'de bant aralığı vermiştir. Bunun sonucunda Mi-1 dayanıklılık geni için PMİ markörünün kullanılabileceği ifade edilmiştir (El Mehrac ve ark., 2005).



Şekil 4.10. PMİ markörü PCR ürünlerinin Kapillar elektroforez görüntüsü (R:550bç, S: 350bç).

Çizelge 4.9. PMİ markörü sonucu

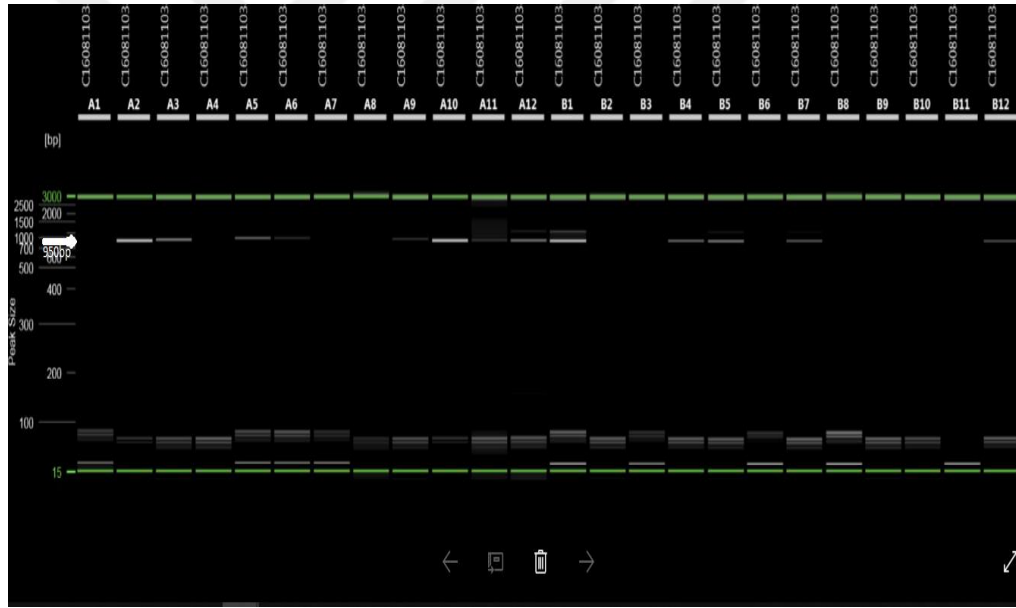
GENOTİP	KÖK-UR NEMATODU (Mİ-1 GENİ) MARKÖRÜ MEVCUDİYETİ
1. Alkan F1	H*
2. Olgun F1	R*
3. Servet F1	S*
4. Çiko F1	-
5. Alsancak F1	-
6. Merkür F1	-
7. Marmara F1	-
8. Nergis F1	-
9. Cazibe F1	S
10. Erzurum sırık	-
11. Van sırık	-
12. Siirt yerli1	-
13. Siirt yerli 2	-
14. Gönen	-
15. Sencan sırık	-
16. Köylüm	S
17. Armut	S
18. Yayla	-
19. Sırık kapıdağ	-
20. Oturak geleneksel	-
21. Patika	-
22. Mountain merit	-
23. NCICELBR	S
24. NC123S	-

*: H: heterozigot dayanıklı; R: homozigot dayanıklı; S: homozigot duyarlı

4.5. Domates mozaik virüsüne (Tomv) ait markörün PCR analiz sonuçları

L. peruvianum'dan aktarılan Tm2² dayanıklılık geni için geliştirilmiş olan SCAR ko-dominant Tomv markörü 24 domates genotipi üzerinde test edilmiştir (Şekil 4.11, Çizelge 4.10). 9 ticari çeşitten 5'nde 950bç elde edilmiştir. Yerli çeşitlerin ise 7 adedinde 950bç elde edilirken kontrol grubunun NC123S çeşidinde 950bç elde edilmiştir. 950bç Hind III ile kesildiğinde duyarlı bireylerde 450bç ve 500bç olarak heterozigot bireylerde ise 450bç, 500bç ve 950bç 'de ayrılmaktadır.

Dax ve ark. (1998) yaptığı çalışmaya göre ise SCAR tomv markörü olarak adlandırıldığı için kesme enzimi gözden kaçırılmıştır. İleri çalışmalarda bu enzim ile kesilip CAPS olarak kullanılması yerinde olacaktır.



Şekil 4.11. Tomv markörüne ait dominant markörü ile elde edilen 950bç markör

Çizelge 4.10. Tomv markörüne ait PCR analizi sonuçları

GENOTİP	950 BÇ BANT MEVCUDİYETİ
1. Alkan F1	-
2. Olgun F1	+ *
3. Servet F1	+
4. Çiko F1	-
5. Alsancak F1	+
6. Merkür F1	+
7. Marmara F1	-
8. Nergis F1	-
9. Cazibe F1	+
10. Erzurum sırık	+
11. Van sırık	+
12. Siirt yerli1	+
13. Siirt yerli 2	+
14. Gönen	-
15. Sencan sırık	-
16. Köylüm	+
17. Armut	+
18. Yayla	-
19. Sırık kapıdağ	+
20. Oturak geleneksel	-
21. Patika	-
22. Mountain merit	-
23. NCICELBR	+
24. NC123S	+

*: (+): bant mevcut * :(-): bant mevcut değil

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Dünyada, Domateste tek ve birden çok özelliği barındıran genler veya QTL'lerle ilgili moleküler belirteçler (markörler) geliştirilmeye devam edilmektedir. Moleküler belirteçler domateste tarımsal açıdan birçok önemli özellik için genlerin ve QTL'lerin belirlenmesinde veya haritalanmasında moleküler yardımcı seleksiyon yöntemiyle kullanışlı ve faydalı olabilmektedir. Bununla birlikte, literatürde belirtilen tüm belirteçler domates ıslah programlarında uygulanamamaktadır. Belirteçleri yeniden tanımlayabilmek, belirli ıslah hatlarında faydalılık, çoğaltılabilirlik, yeni polimorfik belirteçleri tanımlamak ve geliştirmek için genellikle ek çabalar gereklidir. Bu çalışmada, domates lekeli solgunluk virüsü, fusarium solgunluğu, domates yaprak kıvrıcıklığı virüsü, kök-ur nematodu, verticillium solgunluğu, domates mozaik virüsü hastalık ve zararlılar için literatürde belirtilen geliştirilmiş olan markörler içinden 21 tanesi seçilmiştir. Seçilen CAPS ve SCAR markörleri 24 domates genotipi üzerinde test edilmiştir.

Domates lekeli solgunluk virüsü için test edilen SCAR Scr-001 markörü için sonuç elde edilmiştir. Bu sonuç Rosella ve ark. (2001)'nın yaptığı çalışmayla paralellik göstermiştir ve klasik testlemeye alternatif olabileceği söylenmiştir.

Fusarium solgunluğu, (P7-43BF1, PTG-190, TAO1 CAPS markörleri ve P743DF3-P743DR3, P743DF1-P743DR1, At2-F3-At2-R3 SCAR markörleri) SCAR ve CAPS yöntemiyle 24 domates genotipi üzerinde test edilerek sonuç alınmıştır. Bu sonuçlar Barillas ve ark. (2008)'nin çalışmasıyla paralellik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu markörlerin ticari çeşitler için rahatlıkla kullanılabilceği tespit edilmiştir. Bu markörlerden Ptg-190 markörünün belirlediğimiz genotiplerde etkin bir şekilde kullanılmadığı sonucuna varılmıştır.

Domates yaprak kıvrıcıklığı virüsü için SCAR P6-25 ve CAPS JB-1 markörlerini 24 domates genotipi üzerinde test yapılmıştır ve P6-25 için sonuç alınmıştır. Bu sonuç, Pınar ve ark. (2013) ve Prasanna ve ark. (2015)'nin yaptıkları çalışmalarla paralellik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu yüzden ticari çeşitlerin dayanıklılık ve duyarlılık özelliği için kullanılabilceği sonucu ortaya çıkmıştır.

Domates mozaik virüsü için, Tomv markörü 24 domates genotipi üzerinde test edilmesinin sonucunda 950bç homozigot bant elde edilmiştir. Dax ve ark. (1998) göre $tm2^2$ lokusu için kullanılan Tomv markörü CAPS özelliği gösterdiği ve Hind III kesme enzimiyle kesilmesi gerektiği anlaşılmıştır..

Domates lekeli solgunluk virüsünde kullanılan CAPS SW5b-IRR, CT220 ve SCAR421 markörleri, Fusarium solgunluğu için kullandığımız 43BF1 markörü, Domates yaprak kıvrıcıklığı virüsü için kullanılan JB-1 markörü ve Verticillium solgunluğu için geliştirilen, CAPS VVF2 ve Ve1YP markörleri için genotipsel farklılıklar, PCR şartlarındaki farklılıklar, genler ve markörler arasındaki bağlantıların bozulması ve kullanılan markörlerin genomik sekansların eksikliği gibi çeşitli sebeplerden dolayı sonuç almada başarısız olmuştur.

Sonuç olarak, domates ıslah programlarında moleküler belirteç yardımcı seleksiyon amaçlı geliştirilmiş markörlerden sadece yarıya yakın kısmının (9/21) etkin bir şekilde kullanılabileceği anlaşılmıştır. Ayrıca yabancı kaynaklı domates türleri dayanıklılık genlerinin ticari hibrit çeşitlerine aktarılmasından dolayı etkin bir şekilde kullanıldığı görülmekle birlikte yerel kaynaklarda bu belirteçler mevcut olmadığı da teyit edilmiştir. Entansif tarım uygulamaları yüzünden hastalık ve zararlı etkenleri sürekli kendilerini değiştirme kapasitesine sahiptirler. Bu yüzden hastalık ve zararlılara dayanıklılık sağlayan yeni dayanıklılık genlerinin bulunması ve bunlarla ilişkili güvenilir ve etkin belirteçlerin ıslah programlarına gelecekte yoğun bir şekilde kazandırılması önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- Agrios, G. N. 1997. Genetics of plant disease. ***Plant Pathology***, 115-142.
- Aydınlı, 2015 Domateste kök-ur nematodları (*Meloidogyne* spp.)'na dayanıklılık: Mi geni ve virulent popülasyon oluşumu. ***Derim***, 32(2): 211-224.
- Anfoka, G. H., Abhary, M., Stevens, M. R. 2006. Occurrence of Tomato spotted wilt virus (TSWV) in Jordan. ***EPPO Bulletin***, 36(3): 517-522.
- Arens, P., Mansilla, C., Deinum, D., Cavellini, L., Moretti, A., Rolland, S., Mathis, R. 2010. Development and evaluation of robust molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness, uniformity and stability testing. ***Theoretical and Applied Genetics***, 120(3): 655-664.
- Azeri, T. 1981. Preliminary report of tomato spotted wilt virus (TSWV) and its epidemy on tobacco in the Canakkale region of Turkey. ***Journal of Turkish phytopathology***. 10(2/3): 79-87.
- Barillas, A. C., Mejia, L., Sanchez-Perez, A., Maxwell, D. P. 2008. CAPS and SCAR markers for detection of I-3 gene introgression for resistance to *Fusarium oxysporium* f. sp. *lycopersici* race 3. ***Rep Tomato Genetic. Coop***, 58: 11-17.
- Barone, A., Frusciante, L. 2007 Molecular marker-assisted selection for resistance to pathogens in tomato. ***Marker-Assisted Selection, Current Status and Future Perspectives in Crops, Livestock, Forestry and Fish***, 153-164.
- Bayram, M., Sensoy, S., Dasgan, H. Y. 2010, August. Iron (Fe) deficiency tolerance in tomato recombinant inbred lines obtained from tolerant and sensitive genotypes. ***In XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): III International Symposium 918***: 575-582
- Chen, H. M., Lin, C. Y., Yoshida, M., Hanson, P., Schafleitner, R. 2015 Multiplex PCR for detection of tomato yellow leaf curl disease and root-knot nematode resistance genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). ***International Journal of Plant Breeding and Genetics***, 9(2): 44-56.
- Cho JJ, Mau RFL, German TL, Hartmann RW, Yudin LS, Gonsalves D, Provvidenti R, 1989. A multidisciplinary approach to management of Tomato spotted wilt virus in Hawaii. ***Plant Disease***, 73: 375-383.
- Collard, B. C., Mackill, D. J. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. ***Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences***, 363(1491): 557-572.
- Danso, Y., Akromah, R., Osei, K. 2011 Molecular marker screening of tomato, (*Solanum lycopersicum* L.) Germplasm for root-knot nematodes (*Meloidogyne* species) resistance. ***African Journal of Biotechnology***, 10(9): 1511-1515
- Dax, E., Livneh, O., Aliskevicius, E., Edelbaum, O., Kedar, N., Gavish, N., and Sela, I. 1998 A SCAR marker linked to the ToMV resistance gene, Tm2 2, in tomato. ***Euphytica***, 101(1): 73-77.
- Devran, Z., Elekçioğlu, İ. H. 2004 The Screening of F₂ Plants for the root-knot nematode resistance gene, Mi by PCR in tomato. ***Turkish Journal of Agriculture and Forestry***, 28(4): 253-257.

- De Castro, A. P., Blanca, J. M., Díez, M. J., Vinals, F. N. 2007 Identification of a CAPS marker tightly linked to the Tomato yellow leaf curl disease resistance gene Ty-1 in tomato. **European Journal of Plant Pathology**, **117**(4): 347-356
- Doyle, J. J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, **12**, 13-15.
- El Mehrach, K., Hatimi, A., Gharsallah Chouchane, S., Salus, M. S., Martin, C. T., Maxwell, D. P., Vidavski, F. 2005. PCR-based methods for tagging the Mi-1 locus for resistance to root-knot nematode in begomovirus-resistant tomato germplasm. **Acta Horticulture**. **695**:263-270
- FAO, 2016. Statistic database. <http://faostat.fao.org/>. Erişim tarihi: 10.07.2017
- Foolad, M., Zhang, L., Khan, A. A., Nino-Liu, D., Lin, G. 2002. Identification of QTLs for early blight (*Alternaria solani*) resistance in tomato using backcross populations of a *Lycopersicon esculentum* × *L. hirsutum* cross. **Theoretical and Applied Genetics**, **104**(6-7): 945-958.
- Garcia, B. E., Mejia, L., Salus, M. S., Martin, C. T., Seah, S., Williamson, V. M., Maxwell, D. P. 2007 A co-dominant SCAR marker, Mi23, for detection of the Mi-1.2 gene for resistance to root-knot nematode in tomato germplasm. **PCR-Based Markers Protocols. Department of Plant Pathology, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI 53706** pp:1-13
- Garland, S., Sharman, M., Persley, D., McGrath, D. 2005. The development of an improved PCR-based marker system for Sw-5, an important TSWV resistance gene of tomato. **Australian Journal of Agricultural Research**, **56**(3): 285-289.
- Gözel, U., Çiğdem, Y. U. R. T., ÖZEL Ç. 2016. Molecular markers used in nematode taxonomy. **Turkish Bulletin of Entomology**, **6**(2): 179-189.
- Grube, R. C., Radwanski, E. R., Jahn, M. 2000. Comparative genetics of disease resistance within the *Solanaceae*. **Genetics**, **155**(2): 873-887.
- Güldür, M. E. 1997. Şanlıurfa ili için yeni bir virüs: Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV). **Harran Üniv. Ziraat Fak. Dergisi**, **1**(3): 71-76.
- Güllü, M., Çalı, S. 1994. Doğu Akdeniz Bölgesi örtüaltı sebze alanlarında görülen virüs hastalıklarının belirlenmesi üzerinde araştırmalar. **Bitki Koruma Bülteni**. **34** (3-4) 79-93.
- Iberkleid, I., Ozalvo, R., Feldman, L., Elbaz, M., Patricia, B., Horowitz, S. B. 2014. Responses of tomato genotypes to avirulent and Mi-virulent *Meloidogyne javanica* isolates occurring in Israel. **Phytopathology**, **104**(5): 484-496.
- Jiang, G., Qu, W., Cruz, Y., Chang, C. J., Ho, G. Y., Klein, R. S., & Burk, R. D. (1997). PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. **Journal of clinical microbiology**, **35**(6), 1304-1310.
- Kaur, S., Dhaliwal, M. S., Cheema, D. S., Jindal, S. K., Gaikwad, A. K. 2014. Screening of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Germplasm for Root-Knot Nematode Resistance using Conventional and Molecular Marker Technicus. **Indian Journal of Nematology**, **44**(1): 56-61.
- Kuklev, M. Y., Fesenko, I. A., Karlov, G. I. 2009. Development of a CAPS marker for the Verticillium wilt resistance in tomatoes. **Russian Journal of Genetics**, **45**(5): 575-579.
- Kumar, P., Gupta, V. K., Misra, A. K., Modi, D. R., Pandey, B. K. 2009. Potential of molecular markers in plant biotechnology. **Plant Omics**, **2**(4): 141.

- Luna, A. P., Morilla, G., Voinnet, O., Bejarano, E. R. 2012. Functional analysis of gene-silencing suppressors from tomato yellow leaf curl disease viruses. ***Molecular Plant-Microbe Interactions***, 25(10): 1294-1306.
- Özbek, A. G. 2016. ***Development of High-yielding and Disease Resistant Processing Tomato Lines Using Molecular Marker Technology*** Master's thesis, İzmir Institute of Technology
- Özarslandan, A., Ekbiç, E., Elekçioğlu, İ.H. 2010. Domateste kök-ur nematodu (Meloidogyne javanic a (Treub, 1885) Chitwood)'na dayanıklılık sağlayan Mi 1.2 geninin Mi23 SCAR markırı ile belirlenmesi. ***Türkiye Entomoloji Dergisi***, 35(4): 677-686
- Park, Y.H., Lee, Y.J., Kang, J., Choi, Y.W., Son, B., 2008. Development of gene-based DNA marker for verticillium wilt resistance in tomato. ***Korean Journal of Horticultural Science & Technology*** 26(3): 313-319.
- Pandey, K. K., Pandey, P. K., Kalloo, G., Banerjee, M. K. 2003. Resistance to early blight of tomato with respect to various parameters of disease epidemics. ***Journal of General Plant Pathology***, 69(6): 364-371.
- Pegg, G. F., Brady, B. L. 2002. ***Verticillium wilts***. CABI Publishing, New York, ISBN 085199 529 2, USA. 541.
- Pınar, H., Atilla, A., Keleş, D., Mutlu, N., Denli, N., Mustafa, Ü. 2013a. Domates hatlarında *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*'ye dayanıklılığın moleküler markörler yardımıyla belirlenmesi. ***Derim***, 30(1): 15-23.
- Pınar, H., Atilla, A., Keleş, D., Mutlu, N., Denli, N., Mustafa, Ü. 2013b. Domateste Bazı Hastalık ve Zararlılara Dayanıklı Hat ve Çeşit Geliştirmede Moleküler Markörlerin Kullanımı. ***Alatarım***, 12(1):10-18
- Prasanna, H. C., D. P., Rai, G.K, Krishna, R., Kashyap, S.P., Singh, N. K., Malathi, V.G. 2015. Pyramiding Ty-2 ve Ty-3 genes for resistance to monopartite and bipartite tomato leaf curl viruses of India. ***Plant Pathology***, 64(2): 256-264
- Roselló, S., Ricarte, B., José Díez, M., Nuez, F. 2001. Resistance to tomato spotted wilt virus introgressed from *Lycopersicon peruvianum* in line UPV 1 may be allelic to Sw-5 and can be used to enhance the resistance of hybrids cultivars. ***Euphytica***, 119(3): 357-367.
- Staniaszek, M., Kozik, E. U., Marczewski, W. 2007. A. CAPS marker TAO1902 diagnostic for the I-2 gene conferring resistance to *Fusarium oxyporum* f.sp. *lycopersici* race 2 in tomato. ***Plant Breeding***, 126(3), 331-333
- Scott, J. W., Agrama, H. A., Jones, J. P. 2004. RFLP-based analysis of recombination among resistance genes to *Fusarium* wilt races 1, 2, and 3 in tomato. ***Journal of the American Society for Horticultural Science***, 129(3), 394-400.
- Sönmezoğlu, Ö. A., Yıldırım, A., Güleç, T. E., Kandemir, N. 2010. Markör Destekli Seleksiyonun Bugday Islahında Kullanımı. ***Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi***, 27(1): 105-112.
- Şevik, M. A. 2015. Sebze Üretimini Tehdit Eden Viral Hastalık Etmeni: Domates lekeli solgunluk virüsü (Tomato spotted wilt virus-TSWV). Iğdır Üniversitesi ***Fen Bilimleri Enst. Dergisi*** 5(2), 17-23.
- Vardar-Kanlıtepe, Ç., Aras, S., Cansaran-Duman, D. 2010. Bitki ıslahında moleküler belirteçlerin kullanımı ve gen aktarımı. ***Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi***, 67(1): 33-34

- Şalk, A., Arın, A., Deveci, M., Polat, S., 2008. **Özel Sebzecilik**. NKÜ, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Tekirdağ, 488.
- Tanksley, S. D., Young, N. D., Paterson, A. H., Bonierbale, M. W. 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **Nature Biotechnology**, 7(3), 257-264.
- Tekinel N, Dolar MS, Sağsöz S, Salcan Y, 1969. Mersin Bölgesinde ekonomik bakımdan önemli bazı sebzelerin virüsleri üzerinde araştırmalar. **Bitki Koruma Bülteni**, 9: 37-49.
- TÜİK, 2016. Türkiye istatistik kurumu. Bitkisel üretim istatistikleri. <http://www.tuik.gov.tr/>. Erişim tarihi: 10.07.2017.
- Uzun, Aydın. 2010. **Gen teknolojisi ve Biyogüvenlik Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi** 3(2): 67-79
- Yıldırım, A., Kandemir, N. 2001. Genetik markörler ve analiz metodları. Özcan, S. Gürel, E., Babaoğlu, M. **Bitki Biyoteknolojisi II. Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları. Selçuk Üniv. Vakıf Yayınları**, 112-159.
- Yudin, L. S., Cho, J. J., Mitchell, W. C. 1986. Host range of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae), with special reference to *Leucaena glauca*. **Environmental Entomology**, 15(6): 1292-1295

ÖZGEÇMİŞ

Ceylan Pınar Uçar 05.10.1985 tarihinde Malatya’da doğdu. İlköğretim ve lise öğrenimini Mersin’de tamamladı. 2004-2006 yılları arasında Selçuk Üniversitesinde Bahçe Ziraatı bölümünü okudu. 2009 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi’nde başlamış olduğu lisans eğitimini 2014 yılında tamamladı. 2015 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı.

