



**DOMATES BAKTERİYEL KANSER  
VE SOLGUNLUK HASTALIĞINA KARŞI  
DAYANIKLI M3-9 MUTANT DOMATES  
BİTKİSİNDE HARİTALAMA ÇALIŞMALARI**

**FERHAT ÖZDEMİR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI**

**Prof. Dr. Yusuf YANAR  
Yrd. Doç. Dr. Özer ÇALIŞ**

**2016**

**Her hakkı saklıdır**

**T.C.  
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DOMATES BAKTERİYEL KANSER VE SOLGUNLUK HASTALIĞINA  
KARŞI DAYANIKLI M3-9 MUTANT DOMATES BİTKİSİNDE HARİTALAMA  
ÇALIŞMALARI**

**FERHAT ÖZDEMİR**

**TOKAT  
Mayıs - 2016**

**Her hakkı saklıdır**



**Bu tez çalışması;**

**GOÜ Bilimsel Araştırmalar ve Proje Komisyonu tarafından 2014/94 nolu proje alt yapısıyla desteklenmiştir.**

Ferhat ÖZDEMİR tarafından hazırlanan **Domates Bakteriyel Kanser ve Solgunluk Hastalığına Karşı Dayanıklı M3-9 Mutant Domates Bitkisinde Haritalama Çalışmaları** adlı tez çalışmasının savunma sınavı 27 MAYIS 2016 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Danışman  
**Prof Dr. Yusuf YANAR**


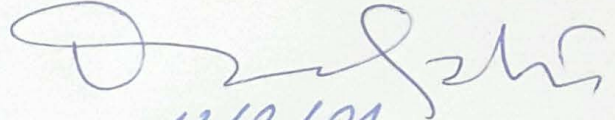
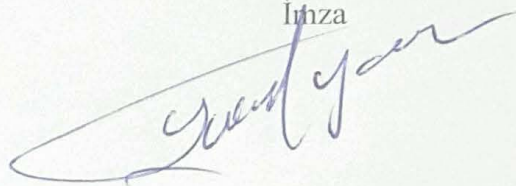
İkinci Danışman  
**Yrd. Doç. Dr. Özer ÇALIŞ**  
Akdeniz Üniversitesi

Üye  
**Yrd. Doç. Dr. Abdurrahman ONARAN**  
Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye  
**Yrd. Doç. Dr. Sabriye BELGÜZAR**  
Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye  
**Yrd. Doç. Dr. Şerife TOPKAYA**  
Gaziosmanpaşa Üniversitesi

İmza



Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

ONAY

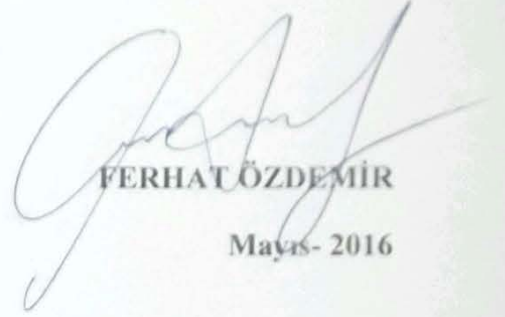
Prof. Dr. Mehmet Ali SAKIN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

10.06/20-16

## TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.



**FERHAT ÖZDEMİR**  
Mayıs- 2016

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

# DOMATES BAKTERİYEL KANSER VE SOLGUNLUK HASTALIĞINA KARŞI DAYANIKLI M3-9 MUTANT DOMATES BİTKİSİNDE HARİTALAMA ÇALIŞMALARI

FERHAT ÖZDEMİR

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. YUSUF YANAR)  
(İKİNCİ DANIŞMAN: YRD. DOÇ. DR. ÖZER ÇALIŞ)

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* domates üretiminde karşılaşılan en zarar verici hastalık etmenlerindedir. Ülkemizde hastalık etmeni birinci derece karantinaya tabidir. Hastalık etmeni ile mücadele konusunda büyük çalışmalar yapılsa da ticari olarak dayanıklı bir çeşit geliştirilememiştir. Bu çalışmada *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'nin en virulent ırkı olan *Cmm2* izolatına dayanıklı M3-9 mutant domates bitkisinde PCR temelli haritalama çalışması yapılarak dayanıklılık lokusunun hangi kromozomda olduğu araştırılmıştır. Bunun için ilk olarak dayanıklı M3-9 mutant domates bitkisi Süvari ticari bitkisi ile melezlenerek M3-9 x Süvari F<sub>1</sub> bitkisi oluşturulmuştur. Oluşturulan F<sub>1</sub> bitkisinin kendilenmesine izin verilerek M3-9 x Süvari F<sub>2</sub> popülasyonu domates bitkileri oluşturulmuştur. F<sub>2</sub> popülasyonunda 80 bitkide patojenisite testi yapılmış ve patojen PCR tekniği ile tanılanmıştır. Patojenisite testi sonucu 23 bitki dayanıklı ve 57 bitki ise hassas olarak fenotipte belirlenmiştir. Patojenisite testi sonucu belirlenen en dayanıklı ve en hassas 9'ar bitkide 120'nin üzerinde markör ile haritalama çalışması yapılmıştır. Yapılan haritalama çalışması sonucu fenotipteki dayanıklılık ve hassaslık durumunu genotipte en belirgin olarak veren markör belirlenmiştir. Çalışma sonucu mutant M3-9 bitkisinde dayanıklılığın 5. kromozomda kontrol edildiği bir INDEL markörü ile belirlenmiştir.

**2016, 70 sayfa**

**ANAHTAR KELİMELEER:** PCR, Markör, Genetik haritalama, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Domates, Dayanıklı çeşit, SSR

## ABSTRACT

### MASTER THESIS

#### MAPPING STUDIES IN M3-9 RESISTANT TOMATO MUTANT PLANT AGAINST BACTERIAL CANCER AND WILTING DISEASE FERHAT ÖZDEMİR

GAZIOSMANPASA UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND  
APPLIED SCIENCES

DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION

SUPERVISOR: PROF. DR. YUSUF YANAR  
CO-SUPERVISOR: ASST. PROF. DR. ÖZER ÇALIŞ

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is one of the most damaging pathogens in tomato production. The pathogen has been subjected to a first-degree quarantine organism in Turkey. There are great management efforts to control the pathogen but there is no resistant commercial varieties developed yet. In this study, we studied M3-9 tomato mutant plants which resistant to the most virulent isolate of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* *Cmm2* using PCR-based mapping analysis to locate the resistant locus on M3-9 chromosomes. Therefore, M3-9 resistant tomato mutant plants were crossed with commercial susceptible Suvari variety and M3-9 × Suvari crosses were established. Then whole F1 plants were selfed them with allowing pollination from others. On 80 F2 tomato plants were inoculated in pathogenicity tests and they were analysed in the PCRs. Pathogenicity tests revealed that phenotypically 57 tomato plants were susceptible and 23 plants were resistant to *Cmm2* in the F2 population. From the F2 population, chosen 9 most resistant and susceptible plants were analysed with more than 120 molecular markers to map resistant locus in the PCRs. Mapping study results have identified the most linked marker in genotypes where the marker was exactly matched with the phenotypes. The M3-9 mutant resistant locus was mapped with an INDEL marker on its 5th chromosome.

**2016, 70 pages**

**KEYWORDS:** PCR, Molecular markers, Resistance, Genetic mapping, *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*, Tomato, Resistant variety, SSR markers

## ÖNSÖZ

Yapılan bu yüksek lisans çalışmasında bakteriyel kanser ve solgunluk hastalık etmenine dayanıklı M3-9 ümit vaat eden mutant domates bitkisinde dayanıklılığın hangi kromozomda olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmanın belirlenmesi kurgulanması ve gerçekleştirilmesi konusunda bilgi ve desteğini hiç bir zaman esirgemeyen değerli danışman hocalarım Prof Dr. Yusuf YANAR ve Akdeniz Üniversitesine tayini çıkan Yrd. Doç. Dr.Özer ÇALIŞ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmanın her aşamasında gerek sera gerek laboratuvar çalışmalarında bilgi ve desteklerini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Sabriye BELGÜZAR hocama, PCR çalışmalarında tecrübe ve bilgilerini paylaşan Yrd. Doç. Dr. Şerife TOPKAYA hocama, Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvarındaki alet ve ekipmanların nasıl kullanılacağını, PCR çalışmalarında engin tecrübe ve bilgilerini paylaşan ayrıca melezlemeler sırasında verdiği bilgilerden dolayı değerli hocam Arş. Gör. İbrahim SAYGILI'ya, jüri üyeliği yapan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Abdurrahman ONARAN hocama ve çalışma boyunca yanımda bulunan ekip arkadaşım Ziraat Mühendisi Halil KARAKAŞ'a sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmanın gerçekleşmesi için projeyi üstlenen Prof. Dr. Halit ÇAM'a bütün yardımlarından ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman arkamda durarak bana güven veren aileme, beni çok seven kardeşim Furkan ÖZDEMİR'e teşekkür ederim.

**FERHAT ÖZDEMİR**

**MAYIS - 2016**

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>ÖNSÖZ</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	v
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	vi
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	viii
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b> .....	ix
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	6
2.1. Domateste <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> Hastalık Etmeni ve Epidemik Durumu .....	6
2.2. Bitkilerde Hastalıklara Dayanıklılık Kavramı ve Moleküler Markörler .....	11
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	14
3.1. Materyal .....	14
3.1.1. Dayanıklı ve Hassas Domates Materyallerinin Temini .....	14
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Bakteriye Etmenin ( <i>Cmm2</i> ) Temini .....	14
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Besi Yerleri .....	15
3.2. Yöntem .....	15
3.2.1. Bitki Materyallerinin Sera Ortamında Yetiştirilmesi .....	15
3.2.2. Domateste F <sub>1</sub> ve F <sub>2</sub> (Haritalama) Popülasyonlarının Oluşturulması .....	17
3.2.2.1. Domateslerin Melezlenerek F <sub>1</sub> Popülasyonlarının Oluşturulması .....	18
3.2.2.2. Melezlemelerden Elde Edilen F <sub>1</sub> Tohumlarının Yetiştirilmesi ve F <sub>2</sub> Tohumlarının Elde Edilmesi .....	21
3.2.3. F <sub>1</sub> ve F <sub>2</sub> Popülasyonu Domates Bitkilerinde Patogenisite Testi .....	22
3.2.4. F <sub>1</sub> ve F <sub>2</sub> Domates Popülasyonlarından Patogenin Geri İzolasyonu ve DNA İzolasyonu .....	26

.....	
3.2.5. Kalıtım Derecesinin Belirlenmesi .....	29
3.2.6. F <sub>2</sub> Haritalama Popülasyonu Bitkilerden DNA İzolasyonu .....	29
3.2.7. PCR Çalışma Metodu .....	31
3.2.7.1. Bakteriyel Patojenin Moleküler Olarak Tanılanması .....	32
3.2.7.2. Haritalama Popülasyonu F <sub>2</sub> 'de Moleküler Çalışmalar ve Kullanılan Markörler .....	32
3.2.7.3. PCR Ürünlerini Jel Elektroforezde Görüntüleme .....	33
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>35</b>
4.1. F <sub>1</sub> Popülasyonunda Yapılan Patojenisite Testi Sonuçları .....	35
4.2. F <sub>2</sub> Popülasyonunda Yapılan Patojenisite Testi Sonuçları .....	35
4.3. F <sub>1</sub> ve F <sub>2</sub> Popülasyonlarından İzole Edilen Bakterilerin PCR İle Tanılanması.	39
4.4. Kalıtım Derecesinin F <sub>2</sub> Popülasyonunda Belirlenmesi .....	41
4.5. F.Ö. (♀M3-9 X Süvari♂ ) F <sub>2</sub> Popülasyonunda Haritalama Sonuçlar .....	43
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	<b>47</b>
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	<b>50</b>
<b>7. EKLER</b> .....	<b>57</b>
EK-A .....	57
EK-B .....	58
EK-C .....	59
<b>8. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>70</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

### Açıklama

Kcal

kilo Kalori

dk

dakika

mg

miligram

$\mu$ g

mikrogram

mm

milimetre

%

yüzde

° C

santigrat derece

g/l

gram/litre

$\mu$ g/ml

mikrogram/mililitre

atm

atmosfer basınç

l

litre

g

gram

### Kısaltmalar

### Açıklama

ÇHC

Çin Halk Cumhuriyeti

FAO

Gıda ve Tarım Örgütü

*Cmm*

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

PCR

Polimeraz Zincir reaksiyonu

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Kısaltmalar

### Açıklama

ABD

Amerika birleşik devletleri

NaOH

Sodyum hidroksit

Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

Sodyum fosfat

HPLC

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi

SSR

Simple Sequence Repeats

SNP

Tek Nükleotid Polimorfizmi

ISSR

Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm

F.Ö.

♀M3-9 X Süvari♂ F<sub>2</sub> popülasyonu

H

Hassas

D

Dayanıklı

HZ

Heterozigot

Bp

Baz çifti

GYCA

Glikoz yeast carbonate agar

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil</b>		<b>Sayfa</b>
Şekil 3.1.	Dayanıklı M3-9 bitkisi (A) ile hassas ticari çeşit Süvari (B) bitkisinin inokulasyon sonrası fenotipik görünümü .....	15
Şekil 3.2.	Dayanıklı M3-9 bitkisi (A) ile hassas ticari çeşit Süvari (B) bitkisinin inokulasyon sonrası iletim demetlerinin görüntüsü.....	16
Şekil 3.3.	Domates fidelerinin viyollerde yetiştirilmesi .....	
Şekil 3.4.	Fidelerin saksılara şaşırtıldıktan sonra serada bakımı .....	17
Şekil 3.5.	Olgunlaştırılmak için polen alınan çiçek (A) ve melezleme yapılan çiçek (B).....	18
Şekil 3.6.	Açmamış domates çiçeğinde taç, çanak ve erkek organların uzaklaştırılması dişi organın tek kalması .....	19
Şekil 3.7.	Çiçekte tozlama ve etiketlenmiş F <sub>1</sub> tohumlarını taşıyan meyvenin erken görünümü .....	19
Şekil 3.8.	♀M3-9 × Ticari♂ ve oluşan meyvesi, ♀Ticari × M3-9♂ ve oluşan meyvesi .....	21
Şekil 3.9.	F <sub>2</sub> tohumlarını taşıyan kendilenmiş domatesler .....	22
Şekil 3.10.	Bakterilerin GYCA besi ortamına steril kabinde çizilmesi .....	23
Şekil 3.11.	Hastalık etmeni patojenin gelişimi (A), bitkilerin gövdesine mekanik inokülasyon (B), kontrol grubu bitkiler (C) .....	24
Şekil 3.12.	Ebeveyn anne M3-9 (A), baba Süvari (B) ve ♀M3-9 x Süvari♂ F <sub>2</sub> popülasyonu kodlanan bitkileri (C) .....	25
Şekil 3.13.	F <sub>2</sub> haritalama bitkilerindeki koltuk gelişimi (A), alınan koltukların köklendirilmesi (B), köklenen klon bitkilerin saksılara şaşırtılması (C) .....	26
Şekil 3.14.	F <sub>2</sub> popülasyonunda patojenisite testinin yapılması .....	26
Şekil 3.15.	Besi ortamına bitki öz sularının aktarılması (A) ve inkübatöre konulması (B) .....	27
Şekil 3.16.	Khi-Kare (x <sup>2</sup> ) testi formülü .....	29
Şekil 4.1.	F <sub>1</sub> domates gövdelerinde kanser ve gövde içersi özün boşalması.....	35
Şekil 4.2.	F.Ö F <sub>2</sub> popülasyonu dirençli bitki fenotipik (A), dirençli bitki gövde kesiti (B), orta hassas bitki fenotipik (C), orta hassas bitki gövde kesiti görünümleri (D) .....	
Şekil 4.3.	F.Ö F <sub>2</sub> popülasyonu dirençsiz hassas bitkilerin fenotipik ve gövde kesitlerinden görünümleri .....	37
Şekil 4.4.	F <sub>1</sub> ve F <sub>2</sub> bitkilerinden geri izole edilen bakteri gelişimleri .....	40

<b>Şekil 4.5.</b>	♀M3-9 X Süvari♂ F <sub>1</sub> ve F <sub>2</sub> bitkilerinden elde edilen bakterilerin orijinal <i>Cmm2</i> ile oluşturduğu 614 bp'lik bantlar .....	40
<b>Şekil 4.6.</b>	Mutant M3-9 domates bitkisi ile hassas Süvari domates bitkisinde PCR amplifikasyonu sonucunda %3'lük metaphor jelde 100 bp'lik lader kullanılarak polimorfizmin araştırılması ...	43
<b>Şekil 4.7.</b>	F <sub>2</sub> popülasyonu bitkilerde SL20210_883i primeri ile yapılan haritalamanın %3'lük Metaphore jeldeki görüntüsü .....	45

## ÇİZELGE LİSTESİ

<b>Çizelge</b>		<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Çizelge 3.1.</b>	Çalışmada kullanılan hibrit hassas domates çeşitlerinin temin edildiği yerler .....	14
<b>Çizelge 3.2.</b>	Patojen tanımlanmasında kullanılan primerler	32
<b>Çizelge 3.3.</b>	PCR amplifikasyonlarında kullanılan kimyasallar, konsantrasyonları ve miktarları .....	32
<b>Çizelge 4.1.</b>	♀M3-9 X Süvari♂ (F.Ö.) F <sub>2</sub> popülasyonunda koltuk alınarak yetiştirilen domates bitkilerinin <i>Cmm2</i> ile inokulasyonundan sonraki 1 ay sonunda 0-5 skalasına göre değerlendirilmesi .....	37
<b>Çizelge 4.2.</b>	♀M3-9 X Süvari♂ F <sub>1</sub> ve F <sub>2</sub> popülasyonu domates bitkilerinde inokulasyon sonrası gövdeden izole edilen patojenlerin <i>CMM5</i> ve <i>CMM6</i> primerleri kullanılarak yapılan PCR amplifikasyonu sonuçlarının değerlendirilmesi .....	41
<b>Çizelge 4.3.</b>	F <sub>2</sub> popülasyonunda yapılan patojenisite testine göre 0-5 skalasına göre değerlendirilen bitkilerin kalıtım derecesinin khikare testi ile değerlendirilmesi .....	42
<b>Çizelge 4.4.</b>	Anne ve baba bitkilerde polimorfik olarak bulunan primerlerin oluşturduğu bantların % 8'lik hata payı ile Bio Capt programında hesaplanması .....	44
<b>Çizelge 4.5.</b>	F <sub>2</sub> popülasyonu bitkilerde SL20210_883i primeri ile yapılan haritalama sonuçlarının skorlanması (A: M3-9, B: süvari, D:Dayanıklı H:Hassas HZ: Heterozigot F.Ö.: ♀M3-9 X Süvari♂ F <sub>2</sub> popülasyonu) .....	46
<b>Çizelge 7.1.</b>	Çalışmada kullanılan SSR markörleri listesi .....	58
<b>Çizelge 7.2.</b>	Çalışmada kullanılan INDEL markörleri .....	67



## 1. GİRİŞ

Domates (*Lycopersicum esculentum* L.) anavatanının Güney Amerika'nın orta ve güney kısımları olduğu bilinen dünyada en fazla ihtiyaç duyulan ve tarımı yapılan sebzelerden birisidir. Güney Amerika'nın batı kıyılarının domatesin anavatanının merkezi olduğu ve Amerika kıtasında, ekvatorun 30° kuzey enlem ve 30° güney enlem sınırları arasında kalan bölgelerin domatesin anavatanı kapsamı içerisinde olduğu bildirilmektedir (Günay, 2005). Domates orijini olan Peru, Bolivya ve Ekvator'dan İspanyollar tarafından 16. yüzyılda Avrupa'ya getirilerek yetiştirilmeye başlanmıştır. Domates adı Peru'da Maya uygarlığı zamanında "xtomatl" ya da "tomatl" olarak adlandırılmıştır (Küçükler, 1994). Domates uzun zaman önce insanları romantik yaptığına inanıldığı için "aşk elması" olarak adlandırılmıştır. Benzer şekilde domates adı İspanyolca "tomate" olarak adlandırılırken, bu isim de Nahuatl dilinde "tomatol"dan alınmıştır (Anonim, 2016a).

Yabani sarı renkli bir domates türü Bolivya ve Peru'da bulunmuştur. Bu yabancı tür Meksika'da yetiştirilmiştir. İlerleyen dönemlerde Kristof Kolomb'un Amerika'yı keşfi ile gemilerle Avrupa'ya gönderilmiştir. Sarı renginden dolayı İtalyanlar onu 'altın elma' olarak adlandırmış, fakat kırmızı türleri çok geçmeden ortaya çıkmıştır. Domates Amerika Birleşik Devletleri'nde ilk defa Thomas Jefferson tarafından yetiştirilmiştir. Ama pek çok insan yemeyi zehirli olduğuna inanarak reddetmiş ve 19.yüzyıla kadar yememişlerdir (Anonim, 2016a). Uzun süre zehirlidir diye çekinilen ve yemeyen domates daha sonra Avrupa'da kültür bitkisi olarak kabul görmüştür (Ekinci, 1972).

Kültür domatesi Kristof Kolomb'un Amerika'yı keşfinden sonra Amerika'dan Avrupa'ya, oradan ise Afrika'ya geçmiştir. Günümüzde kültürü yapılan domateslerin ana materyalinin *L. peruvianum* olduğu, *L. hirsutum*, ve *L. pimpinellifolium*'dan faydalanılarak geliştirildiği bilinmektedir (Vural ve ark., 2000). Anadolu'nun domatesle tanışması 150 yıl önce getirilmesiyle başlamıştır. Günümüzde sevilerek tüketildiği için yaygın olarak yetiştirilmektedir (Yazgan ve Fidan, 1996).

Domates bitkisinin kök sistemi dallanmış kazık kökler ve buradan çıkmış sekonder kökler yani kılcal köklerle oldukça kuvvetli bir yapıdadır. Yaprakları tüylerle kaplı ve bileşik şekilde olan bir bitki türüdür. Erselik çiçek yapısı itibarıyla kendine

döllenebilen bir bitkidir (Vural ve ark., 2000). Toprak isteği itibariyle çok seçici olmayan sebzelerden biri olan domates, pH aralığı 5.5-7 arasında olan topraklarda verim ve kalite bakımından daha iyi sonuçlar vermektedir. Bununla birlikte toprak analizleri yapılmalı ve uygun gübreleme programları uygulanmalıdır (Kasap, 2010).

Domatesin bu kadar fazla talep görmesi ve yetiştirilmesi insan beslenmesi açısından da önemini ortaya koymaktadır. Genel olarak A ve C vitaminleri ve çeşitli mineral maddelerce zengin bir sebze olan domates, 100 g içersinde yetişkin bir kişinin günlük A vitamini ihtiyacının %20'sini, C vitamini ihtiyacının ise %40'ını karşılayabilecek ve 20 kalori veren bir içeriğe sahiptir. A vitamini bakımından daha zengin domates genotiplerini üretmek seleksiyon ıslahı sayesinde yapılabilecek olsa bile yüksek A vitamini içeriğine sahip çeşitlerin renk bakımından istenilen özellikleri sağlamaması ve tüketicilerin bu turuncu renkteki meyveleri tercih etmemesi nedeniyle istenmeyen bir özelliktir (Grierson ve Kader, 1986).

Kalt ve ark., (1999) ile Cano ve ark., (2003)'na göre önceleri yapılan çalışmalardaki amaç domatesin yola dayanım ve raf ömrünün uzatılmasına dayanmaktayken, O'Kennedy ve ark. (2006) ile Shahidi ve Naczk (1995) ise domatesin içerdiği antioksidan aktivitesi yüksek bileşenlerin üzerindeki çalışmalar son yıllarda domatese olan ilgiyi arttırmış ve sağlık üzerindeki faydaları ele alındığını söylemişlerdir.

Domates içeriğinde bulunan likopen vücut tarafından absorbe edilen bir anti-oxidant'tır. Zarar görmüş hücreleri onarmaya yardımcı olur. Anti-oxidant'lar kansere sebebiyet verebilen DNA oksidasyonu ile savaşıyor bir bileşimdir. Kandaki likopen miktarı arttıkça, okside edilmiş bileşikler azalmaktadır (Anonim., 2016b) Kardiyovasküler hastalıklardaki azalışın  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten ve  $\beta$ -kriptoksantin alımındaki artıştan dolayı gerçekleştiği son yıllardaki çalışmalarla bildirilmektedir (Kopsell ve Kopsell, 2006). Willcox ve ark., (2003)'nın bildirdiğine göre domateste likopenin kandaki miktarının artışı ile kardiyovasküler hastalık riskini azalttığı belirtilmektedir. Chan ve ark., (2005) ve Giovannucci (2005)'de yine kandaki likopenin artışıyla prostat kanser riskinin azaldığını söylemektedirler. Hayvanlar üzerindeki çalışmalardan elde edilen sonuçlar ve hücre kültürüyle yapılan çalışmalar da likopenin

antikanserojenik ve damar sertliğini önleyici olarak bulunduğu 'in vitro' ve 'in vivo' çalışmalarla kanıtlanmıştır (Omoni ve Aluka, 2005).

Dünyada en fazla yetiştirilen sebze türlerinden birisi olan domatesin, dünyada toplam 4,8 milyon hektar alanda 159 milyon ton üretimi yapılmaktadır. Yapılan bu üretimde dünyada önde gelen ülkeleri sırasıyla şu şekildedir. Çin Halk Cumhuriyeti (ÇHC), Hindistan, Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Türkiye ve Mısır takip ederken, Hollanda hektara göre verimin en fazla olduğu ülkedir. ÇHC dünya üretiminin yaklaşık üçte birini karşılamakta olup, ülkemizin dünya domates üretiminden aldığı pay %7 seviyesindedir. Bu miktar hem açıkta hem de örtü altında yapılan yetiştiricilik alanlarını kapsamaktadır (FAO, 2012)

Bu kadar büyük üretimi yapılan ve ticari önemi olan domatesin doğal olarak gerek açık alanda gerekse sera koşullarında üretimini ve kalitesini kısıtlayan biyotik ve abiyotik hastalık etmenleri bulunmaktadır. Funguslar, bakteriler, viruslar ve viroidler gibi abiyotik hastalık etmenleri domateste büyük ürün kayıplarına ve kalitenin olumsuz etkilenmesine neden olmaktadır (Karaca ve Saygılı, 1982). Domateste özellikle hastalık oluşturarak ürün kayıplarına neden olan bakteriler şu cinsler içersindedir. *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Erwinia*, *Agrobacterium* ve *Ralstonia* (Üstün, 2008). Domatesin en tahrip edici hastalığı *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al.'in (*Cmm*) patojeninin neden olduğu bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığıdır. Hastalık etmeni tohum kaynaklı olduğundan dolayı mücadele edilmesi çok zor olmaktadır (Erkan, 1988).

Hastalık etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) özellikle sıcaklığın ve nemin yüksek olduğu tropikal ve subtropikal bölgelerde domates üretimini bulaştığı alanlarda zorlaştırmaktadır. Bu durum pestisit kullanılmadan domates yetiştiriciliğinin yapılmasına hiç imkan vermemektedir. Bu yüzden *Clavibacter* domatesin en yıkıcı bakteriyel hastalığıdır. Hastalık bitkilerde gövdede kanser ve tüm bitkide tek taraflı solgunluk belirtileri gösterirken, yapraklarda kavrulmuş leke, ilerleyen dönemlerde iletim demetinde boşalmalar ve ölüm gerçekleştirmektedir. Ayrıca bitkinin gövde ve yaprak damarlarında da kanserler oluşabilmektedir (Agrios, 1997; Çalış ve ark., 2013a).

Solanaceae familyasında bulunan yabancı otlar, bulaşık tohumlar, geçmiş üretim sezonundan kalan bitki artıkları ve hastalık etmeniyle bulaşık topraklar inokulum kaynaklarını oluşturmaktadır (Çetinkaya-Yıldız ve Aysan, 2008). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*' Solanaceae familyasında bulunan bitkilerde zarar oluştursa da en büyük kayıpları domates bitkisinde meydana getirmektedir (Çetinkaya-Yıldız ve Aysan, 2008).

Ülkemizin dışarıdan ithal ettiği tohum, fide ve diğer üretim materyallerinin, hastalık etmeninin birinci derecede karantinaya tabi olmasından dolayı bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı ile bulaşık olmaması gerekir. Bu nedenden dolayı herhangi bir şekilde Türkiye'ye bulaşık bir materyalin giriş yapması kesinlikle yasaktır. Domates üretimini kısıtlayan en önemli hastalıklardan birisi olan bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığının günümüzde hala etkin bir mücadele yöntemi bulunmamaktadır. Hastalıkla mücadelede sadece bitkiyi koruyucu amaçlı kimyasal uygulansa da etkin bir çözüm bulunamamakta ve üretimde artan girdiler çoğalmaktadır. (Çalış ve ark., 2014a). Çalış ve ark., (2014a)'nın belirttiğine göre kimyasalların çevreye olumsuz etkisi ve girdiler göz önünde tutulunca en etkili mücadele yöntemi dayanıklı çeşit kullanmaktır.

Çalış ve ark. (2013b) ve Çalış ve ark. (2014b)'nin bildirdiklerine göre dünyada *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'e karşı dayanıklı ticari bir domates çeşidi bulunmamaktadır. Hastalık etmeninin bu kadar çok tehdit oluşturmasından dolayı ıslahçılar ve bitki korumacılar biyoteknolojik yöntemleri kullanarak domates bitkilerini genetik olarak dayanıklı hale getirmek için çalışmalarını sürdürmektedirler (Martin ve ark., 1993).

Çalış ve ark. (2013a)'nın yaptıkları ters genetik çalışmasında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'e hassas saf hat olan NCEBR3 domates bitkisini etil metan sulfanate (EMS) ile mutasyona uğratmışlar ve elde edilen M1 tohumlarının kontrollü bir şekilde kendilenmesini sağlamışlardır. Oluşturulan M2 popülasyonu bir sonraki generasyona yine kontrollü şekilde kendilenerek M3 popülasyonunun oluşması sağlanmıştır. M2 ve M3 popülasyonlarında en virulent ırk olan *Cmm2*'ye dayanıklı M3-9 ve M3-15 ümitvar mutant domates bitkileri tespit edilmiştir. Bu çalışmanın devamı niteliğinde yaptıkları diğer çalışmalarda dayanıklılığın resesif karakterde bir gen

tarafından kontrol edildiğini belirlemişlerdir. Mutant M3-9 ve M3-15 bitkilerinin genetik farklılıklarını anlamak amacıyla yapılan çalışmalarında farklı genetik özelliklere sahip oldukları belirlemişlerdir (Çalış ve ark., 2013a).

Bu çalışma; Çalış ve ark. (2013a)'nın yaptıkları çalışma sonucu *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'e dayanıklı olarak bulunan mutant M3-9 ümitvar bitkisi ile hassas ticari çeşitlerin melezlenerek genetik zenginlik kazandırılması sonucu Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) temelli haritalama çalışması yapılarak dayanıklılığı sağlayan lokusun hangi kromozom üzerinde olduğunu tespit etmektir.



## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Domateste *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Hastalık Etmeni ve Epidemik Durumu

Domateste bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığına neden olan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* hastalık etmeni gram pozitif bir bakteridir. Bakteriyel etmen ilk *Bacterium michiganense* olarak Erwin F. Smith tarafından isimlendirilmiştir. İlerleyen zamanlarda çeşitli isimlendirmeler olsa da terminolojik isimlendirmenin kabulüyle yaklaşık 50 yıl boyunca *Corynebacterium michiganense* olarak isimlendirilmiştir. Taksonomik sınıflandırmanın gelişmesiyle birlikte, patojen bakterinin hücre duvarı yapısı hakkında yeni bilgiler elde edilmiş ve 1980'li yıllarda *Clavibacter* sınıfı içerisinde sınıflandırma yapılarak *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* olarak adlandırılmıştır (Gleason ve ark., 1993). Hastalık etmeni patojen optimum olarak 20-29 santigrad derecede gelişirken, 35 santigrad derecenin üzerinde ise çok nadir olarak gelişme gösterebilir (Holt ve ark., 1994).

Domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığının birincil inokulum kaynağının tohum olduğu belirtilmektedir. Etmen meyve etinden tohuma bulaşarak, tohumları yüzeysel şekilde kaplamaktadır. Hastalık etmeninin bu sayede bir sonraki generasyonda bulaşık tohumlar aracılığıyla ilk olarak kotiledon yapraklara daha sonra da vasküler dokuya kolaylıkla geçtiği bilinmektedir (Özaktan ve Bora., 1991).

Özaktan (1991)'nın bildirdiğine göre hastalık etmeninin doğal olarak enfekteli tohumlarda etmenin tohuma bulaşma oranı % 1-5 iken yapay olarak enfekte edilen tohumlarda ise tohuma bulaşma oranı % 21-40 olduğu tespit edilmiştir. Hastalık etmeni patojen bulaştığı tohumlarda, tohum kabuğu ya da tohum zarından geçerek tohumda enfeksiyon gerçekleştirir. Patojenin tohumun en iç bölgesinde bulunan embriyoya giremediği saptanmıştır (Patino-Mendez, 1964).

Hastalık etmeni patojen olan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in Önemli inokulum kaynaklarında birisi de etmenle bulaşık topraktır. Patojenin topraktacanlı kalabilmesi üzerine araştırmacılar tarafından farklı çalışmalar yapılmıştır.

Strider (1967) yaptığı çalışmada patajenin toprağa inokulasyonu sonrasında canlı kalabilme süresini araştırmıştır. Çalışma sonucunda hava ile kurutulan bulaşık toprakta inokulasyonu takiben 7. aya kadar etmen geri izole edilebilirken 8. aydan sonra etmen geri izole edilememiştir. Araştırmacı 2 santigrad derecedeki nemli toprakta patojenin 18-30 ay gibi bir süre boyunca toprakta canlılığını sürdürdüğünü ve virülenliğinin devam ettiğini belirlemiştir. Bu çalışmadan elde edilen bilgilere göre hastalık etmeninin canlılığı ve virülenliği üzerine toprak nemliliğinin etkili olduğu görülmektedir.

Belgüzar (2014) Türkiye Tokat şartlarında 2012 yılı yaz ve kış aylarında yaptığı çalışmada hastalık etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in toprakta kalabilme süresini araştırmıştır. Yaz aylarında hastalık etmeni 15. gün sonrasında geri izole edilemezken, kış aylarında 28. gün sonrasında geri izolasyonlarda hastalık etmenine rastlanmamıştır. İtalya'da Ciccarone ve Carili (1948) yaptıkları çalışmada hastalık etmeninin toprakta canlılığını araştırmışlar ve 4 yıl canlılığını koruyabildiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmalardan anlaşılacağı üzere hastalık etmeni patojen olan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in toprakta kalıcılığı bölgelere göre 15 gün ile 4 yıl arasında farklılık gösterdiği anlaşılmaktadır.

Hastalık etmeni patojenin bir diğer inokulum kaynağı ise bulaşık bitki atıklarıdır. Fatmi ve Schaad (2002) yaptıkları çalışmada patojenle bulaşık bitki artıklarında hastalık etmeni patojenin canlı kalabilme süresini farklı coğrafik bölgelerde araştırmışlardır. Araştırmada toprak yüzeyindeki bulaşık domates gövdelerinde; ABD'nin Ohio ve California eyaletlerinde 314, Fas'ın Melk Zhar bölgesinde 194 ve Fas'ın Ait Melloul bölgesinde 132 gün süreyle canlılığını sürdürebildiğini belirlemişlerdir. Aynı bölgelerde toprağa gömülen bulaşık domates gövdelerinde ise California'da 240, Ohio'da 340, Melk Zhar ve Ait Melloul'da 60 gün süreyle canlılıklarını koruduklarını saptamışlardır. Belgüzar (2014)'ın Türkiye Tokat şartlarında Temmuz 2013-Temmuz 2014 tarihleri arasında yaptığı çalışmada toprağa gömülen bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığıyla bulaşık domates artıklarında patojenin canlı kalabilme süresini araştırmıştır. Araştırma sonucunda patojenle bulaşık bitki artıklarında 1 ay süreyle hastalık etmeni patajenin canlı kalabildiğini saptamıştır. Araştırmacıların sonuçlarına göre hastalık etmeni patojen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in bulaşık bitki artıklarındaki canlılık

süreleri üzerine coğrafi bölge, bulaşık bitki artığının toprakta olması veya olmaması durumları etki etmektedir.

Hastalık etmeninin oluşturduğu semptomlar sistemik ya da lokalize enfeksiyonların oluşmasına göre farklılık gösterir. İkincil enfeksiyonların oluşturduğu semptomlar genelde sınırlı olup, asıl semptomları genelde birincil enfeksiyon olan sistemik enfeksiyonlar oluşturmaktadır. Enfeksiyon tohum ya da açılan yaralar ile gerçekleşmiş ve patojen iletim demetlerine ulaşmışsa sistemik enfeksiyon gerçekleşir. Sistemik enfeksiyon bitkide kendini ilk olarak solgunluk semptomuyla göstermektedir. Sistemik enfeksiyon sonucu genç fidelerde hızla solma ve çökmeler, yaşlı domates bitkilerinde ise solgunluk semptomu yavaş yavaş gerçekleşir. Patojenin sistemik olarak enfekte ettiği bitkilerin gövdelerinde iletim demetlerinin renk bozulması ile önce sarıya ilerleyen dönemlerde kahverengiye dönen bir renk aldığı görülürken, gövdelerde dikey şekilde çatlamlar yani kanserler görülür (Yıldız, 2007).

Bakteriyel hastalık etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in bitkiye giriş enfeksiyonu doğal açıklık ve yaralar yolu ile olmuş ise ilk olarak bitkide nekrozlar ve yaprakta meydana gelen lekeler ile oluşan lokalize semptomlar meydana gelir. Lokalize enfeksiyonun ilk semptomları genellikle yaprakçıkların kenarındaki nekrozlar oluşturmakta ve buna 'yanmış faz' ismi verilmektedir. Yanmış faz belirtisi ilk olarak kahverengilik alt yaprakçığın kenarlarının kurumasıyla başlayarak kendini göstermektedir. Nekrotik alanlar zamanla genişler yaprak ve zamanla bütün bitki gövdesinin büzülmesine neden olur. Diğer bir deyişle lokalize enfeksiyonlar zamanla sistemik enfeksiyonlara dönüşebilmektedir. Hastalık etmeni patojenin ilerlediği dönemlerde domates meyvesinde meyvenin albenisini düşüren kenarları beyaz haleli ortası kahverengi 'kuş gözü' adı verilen spesifik semptomlar oluşmaktadır. Etmen *Solanaceae* familyasında hastalık oluşturuyor olsa da bu familya içerisinde en fazla semptom gösterdiği ve hastalık oluşturduğu bitki domatestir (Yıldız, 2007).

Hastalık etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in domateste meydana getirdiği tahrip edici zararların önüne geçilebilmesi için en başta sistemik enfeksiyonları meydana getiren inokulum kaynağı olan bulaşık tohumlar, bulaşık topraklar ve bulaşık bitki artıklarından ari üretim yapılması gerekmektedir. Daha sonra

ise üretim sezonu boyunca yapılan budama, koltuk alma gibi bir takım işlemler sırasında hastalıkla bulaşık bitkilerden sağlıklı bitkilere hastalığın bulaşmaması için dikkatli olunmalıdır.

Çalış ve ark., (2014a)'nın da belirttiğine göre araştırmacılar bakteriyel kanser ve solgunluk etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ile mücadele konusunda çeşitli araştırmalar yapsalar da günümüzde etkin bir mücadele yöntemi geliştirilememiştir. Günümüzde hastalık etmeniyle mücadelede kullanılan pestisitler sadece koruyucu amaçlı olup hastalık ile mücadelede kesin bir etki sağlayamamaktadır. Bu bakımdan hastalıktan kaynaklı kayıplar, üretimde artan girdilerin yanı sıra kimyasalların da hem çevre hem de insan sağlığı üzerine zararı göz önüne alınca çevreci ve en etkili mücadele yöntemi olarak dayanıklı çeşit kullanmak gerektiği anlaşılmaktadır (Çalış ve ark., 2014a).

Domateste bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığına dayanıklılık açısından baktığımızda dayanıklılık kaynağı olarak domatesin yabancı türlerinden *Lycopersicum hirsutum*, *L. peruvianum* ve *L. pimpinellifolium* tanımlanmaktadır (Sandbrink ve ark., 1995). Araştırmacıların bazıları hastalık etmenine karşı dayanıklılığın çok gen yani kantitatif bir dayanıklılık olduğunu bildirirken bazıları ise tek gen yani kalitatif bir dayanıklılık ile hastalığın kontrol edildiğini bildirirler (Karabulut, 2014; Lindhout ve Purimahua., 1989).

Kabaş ve ark., (2010)'nın bildirdiğine göre Türkiye'de hastalık etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* patojenine karşı tescil ettirilen 577 adet ticari domates çeşitleri içerisinde hastalığa karşı dayanıklı bir çeşit bulunamamıştır.

Hastalık etmeni patojen olan *Cmm* 20. yüzyılın başında ilk olarak ABD'nin bir eyaleti olan Michigan'da saptanmıştır. Hastalık etmeni ilk defa görüldüğü zamandan itibaren dünyanın çeşitli domates üretim yerlerinde tespit edilmiştir (Gleason ve ark.,1993). *Cmm*'nin Kenya, Ontaria ve Carolina gibi domates üretimi yapılan yerlerde epidemi zamanlarında %60-80'nin üzerinde kayıplar oluşturduğu bildirilmiştir (Sherf ve Macnab., 1986).

Hastalık etmeni patojen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Türkiye’de Tokgönül (1998)’ün bildirdiğine göre İç Anadolu’da ilk olarak Ankara’da saptanmıştır. Daha sonraki yıllarda sırayla domates üretim alanlarında hastalık etmeni *Cmm*’nin varlığı çeşitli araştırmalarla belirlenmiştir. Güney Doğu Anadolu’da Bremer ve ark., (1952), Marmara’da Karahan (1965), Ege’de Karaca ve Saygılı (1977), Doğu Akdeniz’de Çınar (1980), Çukurova’da Öktem (1985), Batı Akdeniz’de Basım ve ark.,(2004)’nın yaptığı çalışmalar bu bölgelerde hastalık etmeni *Cmm* patojeni bulunduğunu belirtmiştir.

Öktem (1984) Ankara’da yaptığı çalışmada hastalık etmeni patojen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*’in bu ilde % 0.5 ile % 23 oranında yaygınlık gösterdiğini belirtmiştir. Tespit çalışmalarının yapıldığı ilçelerde bazı alanlarda hastalık etmeniyle bulaşık alanların %100 olduğunu da bildirmiştir.

Özyılmaz (2001) yaptığı survey çalışmalarında İç Anadolu bölgesinde *Cmm*’nin varlığını 14 ilde araştırmıştır. Domates üretim alanlarında 354 noktadan örneklemeler almışlar yapılan araştırma sonucunda Afyon ili haricinde diğer illerde bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığının varlığını tespit etmişlerdir. Hastalık en yaygın olarak Isparta ilinde %5.25 olarak tespit edilmiştir.

Doğu Anadolu bölgesinde Erzincan’ın Oltu Erzurum’un İspir ve Artvin Yusufeli ilçelerinde Target ticari domates çeşidinin üretildiği 6 farklı üretim alanlarında hastalığın yaygınlığı araştırılmıştır. Araştırmada elde edilen izolatlar biyokimyasal ve yağ asid metil ester analizleriyle *Cmm* olarak tanımlanmıştır. Bu çalışma sonucunda hastalık yaygınlığının bu ilçelerde %100 olduğu saptanmıştır (Şahin ve ark., 2002).

Basım (2002) tarafından Isparta ili ve çevresinde yapılan çalışmada örtü altı domates üretim alanlarında yaptıkları surveylerde 40 tane seranın hastalık etmeni patojen olan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ile bulaşık olduğunu bildirmektedir.

Yıldız (2007)’in Doğu Akdeniz bölgesinde Antalya, Adana, Mersin, Marmara bölgesinde Bursa, Ege bölgesinde İzmir ve Doğu Karadeniz bölgesinde Artvin’de yaptığı surveylerde domates bitkilerinde hastalığın semptomik olarak yoğun bir şekilde

görüldüğünü belirtmiştir. Domates üretimi yapılan bu illerde hastalık belirtilerinin önceki sezonda daha yüksek olduğu ve bölgede %70-80 dolaylarında görüldüğünü bildirmiştir.

Belgüzar (2014) Tokat Merkez ve ilçelerinde Domateste *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in neden olduğu Bakteriyel Solgunluk ve Kanser Hastalığının bulunma oranlarını belirlemek için survey çalışmaları yapmıştır. 2011 yılında 65 domates tarlasında, 2012 yılında ise 163 domates tarlasında surveyler yaparak örnekler almıştır. 2011 yılında 543 da'lık alanda, *Cmm* etmeninin neden olduğu hastalığın arazide bulunma durumu %9.64, 2012 yılında ise 1246.5 da'lık alanda *Cmm* etmeninin neden olduğu hastalığın arazilerde bulunma durumu ortalama %4.98 olarak belirlemiştir. 2011 yılında bölgede hastalığa rastlanma oranı Merkez'de %88.88 iken ilçelerde ise Niksar'da %54.54, Erbaa'da %52.38, Turhal'da %46.15 ve Pazar'da %18.18 olarak, 2012 yılında hastalığa rastlanma oranı en fazla Erbaa ilçesinde %61.90 olarak bulmuştur. Tokat Merkez'de %52.85, Turhal ilçesinde %47.72, Pazar ilçesinde %44.44 ve Niksar ilçesinde ise hastalığa rastlamamıştır.

## **2.2. Bitkilerde Hastalıklara Dayanıklılık Kavramı ve Moleküler Markörler**

Bitkilerde hastalığa dayanıklılık kavramı, hastalık oluşturan patojen etmenlerin çoğalma ve gelişme göstermesini bitkiler tarafından engellenmesidir (Roberts, 2002). Bitkilerin hastalık etmenlerine karşı dayanıklılığı; hastalığa yüksek direnç, orta derecede direnç ve düşük direnç şeklindedir. Bitkiler hastalık etmenine yüksek düzeyde direnç gösteriyorsa patojen hiçbir şekilde çoğalamaz ya da çok düşük düzeylerde çoğalabilir. Direnç orta ve düşük seviyelerde ise hastalık etmeninin çoğalması belli bir seviyede meydana gelir. Buna karşın patojene direnç göstermeyen bitkilerde etmen tamamen çoğalır ve meydana getirdiği yoğun enfeksiyon sonucu bitkilerin ölümüne neden olabilmektedir. Genetik dayanıklılık kalıtımsal olarak; tek gen dayanıklılığı, birkaç gen dayanıklılığı ve çok gen dayanıklılığı şeklindedir (Roberts, 2002).

Dayanıklılığın kalıtımsal durumunu bilmek ıslah çalışmalarında büyük önem arz etmektedir. Tek gen dayanıklılığı ile kontrol edilen dayanıklılık ıslahları diğer dayanıklılık şekillerine göre oldukça basittir ve sonuç elde edebilmek daha kolaydır. Çok gen dayanıklılığında ise dayanıklılık bitki genomunda birden fazla bölgede etkili

olmakta bunun sonucunda da Mendel'in genetik açılımına uygun oranlar vermeyebilmektedir (Geiger, 1989). Bu durumda ölçümler kantitatif olarak yapılmakta ve dayanıklılığı sağlayan farklı yerlerdeki her bölgeye QTL denilmektedir (Young, 1996).

Klasik ıslah yöntemlerinde bu direnç kaynaklarının özelliklerinin belirlenmesi fazla iş gücü ve uzun zaman gerektirerek oldukça güç olmaktadır. Aynı zamanda geleneksel yöntemlerle ıslah edilen ya da oluşturulan yeni popülasyonlarda ( $F_1$ ,  $F_2$ ..., vb.) özellikle çok gen direncinde testlerin yapılması hemen hemen imkansızdır. Bütün bu durumlar göz önüne alındığı zaman karşılaşılan zorlukların moleküler markörler yardımıyla giderilmesi daha da kolaylaşmaktadır (Ballvora ve ark., 1995; Bradshaw ve ark., 1998; Lu ve ark., 1999). Klasik ıslah çalışmalarında markörlerin kullanılmasıyla gen etiketleme ve gen haritalama çalışmalarının süresini kısaltan yöntemle Markör Destekli Seleksiyon (MAS) adı verilmektedir (Joshi ve ark., 2000).

Çalışmalarda kullanılacak moleküler markörler; polimorfik olmalı ve bütün genomda kullanılabilir, genetik farklılıkları ortaya çıkarmada yeterli olmalı, çok sayıda güvenilir ve bağımsız markör üretmeli, az miktarda doku ya da DNA gerektirmeli, hızlı, basit ve bütçeye uygun olmalı, farklı fenotipler arasında bağlantı kurabilmesi gibi özellikler taşıdığında ideal bir moleküler markör çalışmasında avantaj sağlar. Ancak hiçbir moleküler markör bu özelliklerin hepsini birden taşımamaktadır. Moleküler markörler kullanım amaçlarına göre su şekilde sıralanabilir;

1. Geçiş türüne göre (maternal çekirdek kalıtımı, biparental çekirdek kalıtımı, paternal organel kalıtımı, maternal organel kalıtımı,)
2. Gen aksiyonuna göre (kodominant ve dominant markörler)
3. Analiz metotlarına göre (PCR temelli olmayan = Hibridizasyon ve PCR temelli markörler) (Kesawat ve Das, 2009).

Basit dizi tekrarları (SSR-Simple Sequence Repeats) markörleri mikrosatellitler olarak ta bilinmektedir. Bu markörler DNA dizileri içinde tekrar eden 1-6 bp'ni taramaktadır. SSR primerleri akrabalık derecesi bulunan türler arası farklı canlılarda kullanılabilir. Mikrosatellit sayılarının farklılığına sebep olan temel olaylar DNA replikasyonu sırasında meydana gelmiş olan dizi atlama, doğru olmayan baz eşleşmeleri

ya da krossing-over olaylarının eşit olmamasından kaynaklanır. Bu durum jel elektroforeziyle kolayca belirlenebilmektedir (Matsuoka ve ark., 2002).

SNP (Single Nucleotide Polymorphism) markörleri, popülasyonlardaki bireylerin genomunda meydana gelen tek nükleotid farklılıkları olarak bilinmektedir. Bitkiler dahil bir çok canlı türünde ortaya çıkabilen bir varyasyondur. Eklenme ve silinme SNP oluşmasında (InDel) nükleotid dizisi değişimine neden olan temeldir. Gen haritalamada, MAS ile ıslah ve harita temelli gen klonlama çalışmalarında çok etkin bir şekilde kullanılmaktadır. SNP oluşumları aksi bir durum olmazsa DNA bölgelerinin kodlama yapmayan yerlerinde görülmektedir. Aynı zamanda kodlama yapan bölgelerde de meydana gelebilmektedir. Bu durumda aminoasit dizisinde değişime sebep olabildiği durumlar olurken, aminoasit dizisinde hiçbir değişikliğe de neden olmayabilir. Bu durumda genin kodladığı üründe veya gende herhangi bir değişiklik meydana gelmez (Sunyaev ve ark., 1999).

Günümüzde moleküler markör teknikleri karşılaştırıldığında kodominat yapıda ve polimorfizmi yüksek SSR ve SNP markörlerinin diğer markör tekniklerine göre daha fazla tercih edildiği bildirilmektedir ( Eserkaya-Güleç ve ark., 2010).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Dayanıklı ve Hassas Domates Materyallerinin Temini

Çalışmada kullanılan domates materyalleri daha önceden test edilerek fenotipte dayanıklı veya hassas olarak tespit edilmiş çeşitlerdir. Çalışmanın ana materyalini oluşturan ve dayanıklılığın haritalanacak olduğu bitki M3-9 ümitvar mutant saf hat domates çeşididir. Hassas fenotip gösteren bitkiler ise farklı tohum firmaları tarafından üretilip piyasada yetiştirilen F<sub>1</sub> domates çeşitleridir.

**Çizelge 3.1.** Çalışmada kullanılan hibrit hassas domates çeşitlerinin temin edildiği yerler

Domates Çeşidi	Çeşit Özelliği	Temini
1 Newton	Hibrit F <sub>1</sub>	Syngenta, Antalya
2 Alkan	Hibrit F <sub>1</sub>	Yüksel Tohumculuk, Antalya
3 Süvari	Hibrit F <sub>1</sub>	Yüksel Tohumculuk, Antalya
4 Marmara	Hibrit F <sub>1</sub>	Yüksel Tohumculuk, Antalya
5 Esin	Hibrit F <sub>1</sub>	Syngenta, Antalya

Dayanıklı olarak tespit edilen M3-9 bitkisi daha önceden EMS (etil metan sülfanate) mutajeniyle mutasyona uğratılmış EBR3 bitkisinden elde edilmiştir. GOÜ Ziraat Fakültesi içersinde yer alan Bitki Koruma Anabilim dalı Fitopatoloji laboratuvarındaki tohum koleksiyonu içersinden temin edilmiştir. Bu dayanıklı olarak bulunan M3-9 domates çeşidi homozigot yapıda olup, kontrollü şekilde kendileme işlemleri yapıldığı için heterozigot açılım göstermemektedir.

##### 3.1.2. Çalışmada Kullanılan Bakteriyel Etmenin (*Cmm2*) Temini

*Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*'in domates bitkileri üzerinde en fazla hastalık semptomuna neden olan *Cmm2* ırkı Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesinde bulunan Fitopatoloji bölümündeki stoklardan temin edilmiştir.

### 3.1.3. Çalışmada Kullanılan Besi Yerleri

Domateste Bakteriyel Kanser ve Solgunluk Hastalık etmeni bakteri olan *Cmm2* ırkının F<sub>1</sub> ve F<sub>2</sub> bitkilerinde patojenisite testi için geliştirildiği besi yeri glikoz yeast carbonate agar (GYCA)'dır. Bu ortamda etmen hem daha yoğun bir şekilde gelişmekte hem de daha hızlı sürede gelişme göstermektedir. F<sub>1</sub> ve F<sub>2</sub> bitkilerinden etmen geri izole edildikten sonra King-B besi yerinde geliştirilmiş ve PCR tekniği ile tanılanmak için stoğa alınmıştır. Besi yerlerinin içerikleri Ek-A'da verilmiştir.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Bitki Materyallerinin Sera Ortamında Yetiştirilmesi

Çalışmanın ana materyallerinden olan M3-9 domates bitkisi ve hibrit özellikte olan ticari çeşitler daha önceden bakteriyel patojen *Cmm2* ile test edilmiştir. Yapılan testler sonucunda çalışmada kullanılacak olan domates çeşitlerinden ticari; Esin, Marmara, Alkan, Süvari ve Newton bunların yanında ayrıca M3-9 ümitvar mutant domates çeşidi de fenotipik olarak skorlanmıştır. Bu skorlamada ticari çeşitlerin etmene karşı olan duyarlılığı ve M3-9 ümitvar mutant domateslerin patojene karşı dayanıklılığı (Şekil 3.1. ve şekil 3.2.) ispat edilmiştir (Çalış ve ark., 2013a).



**Şekil 3.1.** Dayanıklı M3-9 bitkisi (A) ile hassas ticari çeşit Süvari (B) bitkisinin inokulasyon sonrası fenotipik görünümü



**Şekil 3.2.** Dayanıklı M3-9 bitkisi (A) ile hassas ticari çeşit Süvari (B) bitkisinin inokulasyon sonrası iletim demetlerinin görüntüsü

Çalışmada kullanılan M3-9 ve ticari domatesler uygun sera ortamında çalışmanın her aşamasında aşağıda belirtilen şekilde standart olarak yetiştirilmiştir. Tohum yatağı olarak viyoller içersinte steril torf ihtiva eden ortam kullanılmıştır (Şekil 3.3.). Tohumlar bu ortamlara 0.5 cm derinlikte her bir popülasyonun karışmaması için etiketlenerek ekimi yapılmıştır. Ekimi yapılan domates tohumlarını bulunduran viyoller GOÜ Biyoteknoloji serasında 16 saat ışık 8 saat karanlık ortam ve sıcaklığı ortalama 25 °C olan kontrollü ortamda %60 nispi nemde yetiştirilmiştir. Sonra standart bir şekilde sulama işlemleri gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 3.3.** Domates fidelerinin viyollerde yetiştirilmesi

Ekimi yapılan domates tohumları çimlenip çıkış yaparak 2-3 gerçek yapraklı fide haline geldiği zaman saksılara şaşırtılmıştır. Şaşırtıldıkları ortam aynı oranda toprak, perlit, torf ve yanmış hayvan gübresi ihtiva etmektedir. Bu ortam daha önceden hastalık ve zararlılardan arındırılmak amacıyla 1 atm basınçta 15 dk 121 °C’de otaklav edilmiştir. Domates fideleri saksılara şaşırtıldıktan sonra sera ortamında kontrollü bir şekilde gelişmeye bırakılmıştır. Bu esnada domateslere koruyucu ilaçlamalar ve bitki besin maddeleri verilmiş standart olarak günlük sulamaları yapılmıştır (Şekil 3.4.).



**Şekil 3.4.** Fidelerin saksılara şaşırtıldıktan sonra serada bakımı

### **3.2.2. Domateste F<sub>1</sub> ve F<sub>2</sub> (Haritalama) Popülasyonlarının Oluşturulması**

Tek bazlık mutasyona sebep olan EMS ile mutasyona uğratılan NCEBR3 bitkisinden meydana gelen M3-9 bitkisi ile orijinal NCEBR3 bitkisinden elde edilecek olan F<sub>2</sub> bitkilerinden moleküler olarak haritalama çalışmasının çok zor olması nedeniyle M3-9 bitkisi ticari çeşitlerle melezlenip genetik havuzu zenginleştirilmiştir. Melezlemeler sonucunda hastalığa dayanıklı M3-9 domates çeşidi ve ticari F<sub>1</sub> bitkilerinden elde edilen yeni F<sub>1</sub> bitkileri sera ortamında kontrollü bir şekilde geliştirilmiştir. Çiçek dönemine geldiğinde M3-9xTicari F<sub>1</sub> bitkilerinin çiçekleri

havalanmaya izin veren ancak polen geçişini engelleyen parşömen kağıtlarıyla kapatılarak kontrollü bir şekilde kendilenmesi sağlanmış olup F<sub>2</sub> bitkileri tohumlarının oluşması sağlanmıştır. Genetik havuzu zenginleştirilerek oluşturulan M3-9xTicari F<sub>2</sub> popülasyonu haritalama çalışmalarında kullanılmıştır.

### 3.2.2.1. Domateslerin Melezlenerek F<sub>1</sub> Popülasyonlarının Oluşturulması

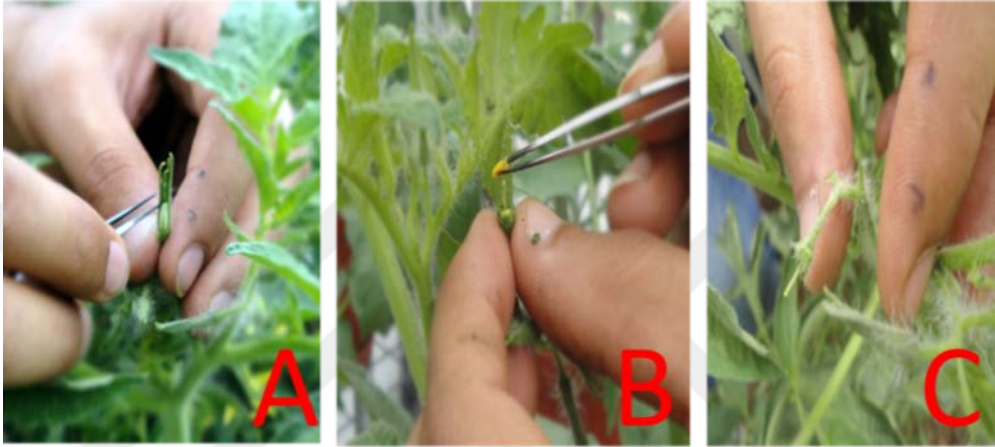
Viyollere tohumları ekilen dayanıklı mutant M3-9 ve hibrit ticari çeşitler sera ortamında 3.2.1.'de anlatıldığı gibi yetiştirilmiştir. Bitkiler çiçeklenme dönemine geldiğinde tam olarak açmış çiçeklerden polenleri steril petri kaplarına alınarak serin ve güneş görmeyen ortamda 2-3 gün sonra tam olarak açmamış çiçeklerde melezleme yapılabilmesi için olgunlaşması sağlanmıştır (Şekil 3.5.).



**Şekil 3.5.** Olgunlaştırılmak için polen alınan çiçek (A) ve melezleme yapılan çiçek (B)

Dayanıklı M3-9 ve hassas ticari çeşitlerin melezlenmesi işlemleri tam olarak açmamış çiçeklerde gerçekleştirilmiştir. Melezleme işlemine başlamadan önce eller ve melezleme aletleri %70'lik etil alkol (Ek-B) ile steril edilmiştir. İlk olarak tam olarak açmamış çiçekler seçilmiştir. Bu çiçeklerin taç ve çanak yaprakları çiçeğin iç bölgelerinde bulunan ovaryuma zarar vermeden steril pens ile uzaklaştırılmıştır. Daha sonra içersinde erkek organları bulunan kısım ovaryum ve dişi tepesine zarar vermeden uzaklaştırılmıştır.

Bu işlemlere Emaskulasyon ve Kastrasyon denilmektedir. Melezleme yapılabilmesi için dişi organ tek başına bırakılmıştır (Şekil 3.6.). Dişi organ tek başına bırakıldıktan sonra tozlama işlemine geçilmiştir. Havanın durumuna ve dişi çiçeğin stigmasının olgunlaşmış olmasına göre tek başına bırakılan dişi çiçekler hemen önceden olgunlaştırılan polenlerle tozlama yapılmış ya da kese kağıdı içersine alınıp stigmanın olgunlaşması beklenmiştir.



**Şekil 3.6.** Açmamış domates çiçeğinde taç, çanak ve erkek organların uzaklaştırılması dişi organın tek kalması

Çanak, taç ve erkek organların uzaklaştırılmasından sonra tek başına bırakılan dişi organ daha önceden melezlemelerde kullanılmak amacıyla olgunlaştırılmış petri kabı içersindeki polenlere daldırılarak tozlama işleminin yapılması sağlanmıştır. Bu işleme polinasyon adı verilmektedir. Bu işlemden sonra melezleme yapılan çiçek bir parşomen kağıda geçirilerek etiketlenmiştir. Bu parşomen kağıdın özelliği ise hava ve ışık geçirebilirken polen geçişine engel olmasıdır. Böylece dışarıdan gelebilecek olan herhangi başka domates çeşidinin polenleriyle döllenme olmayacaktır (Şekil 3.7.).



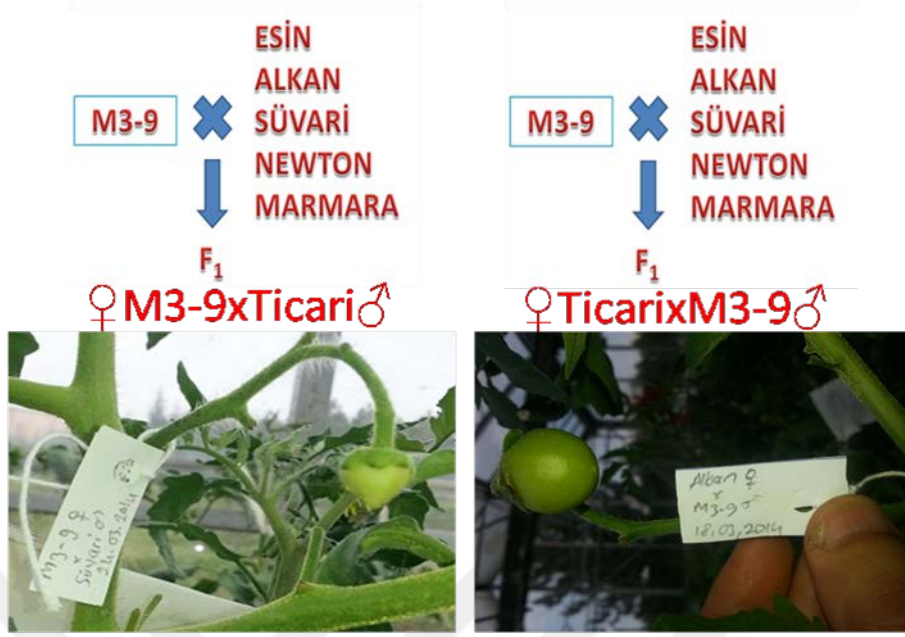
**Şekil 3.7.** Çiçekte tozlama ve etiketlenmiş F<sub>1</sub> tohumlarını taşıyan meyvenin erken görünümü

Melezleme işlemleri günün serin saatleri olan sabah ve akşam üzerileri yapılmıştır. Bunun sebebi ise dişik tepesinin üzerindeki sıvının yüksek sıcaklıktan dolayı kurummasına ve yapılan tozlamadaki polenlerin dişik tepesine yapışmamasına engel olmaktır. Böylece dölleme kontrollü bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

İlerde çıkabilecek sorunlardan dolayı 5 ticari popülasyonla M3-9 mutant domates melezlenerek F<sub>1</sub> hibrit bitkiler oluşturulmuştur. Burada ilerdeki aksamalar böylece giderilmiş olmaktadır. Yani melezleme sonucu oluşturulan herhangi bir M3-9xTicari F<sub>1</sub> tohumları yeterli olmadığında veya ekildikten sonra doğal afet, hastalık, zararlıdan kaynaklı bir sıkıntı yaşandığı zaman 5 ticari çeşitten herhangi başkasıyla yapılan melezlemelerden elde edilen F<sub>1</sub>'lerin kullanılması planlanmıştır.

Yapılan çalışmada domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığının en yıkıcı ırkına dayanıklı olan M3-9 mutant domates çeşidi ile ticari çeşitler arasındaki melezlemeler şu şekilde yapılmıştır. Anne olarak dayanıklı çeşidimiz olan M3-9 kullanılırken baba olarak hassas ticari çeşitlerin kullanıldığı gibi, anne olarak hassas ticari bitkiler kullanılırken baba olarak dayanıklı mutant M3-9 bitkileri kullanılarak ta melezlemeler 2 yönlü olarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.8.).

Yapılan melezlemeler her bitkide 3 tane çiçeği geçmeyecek ve 3 günde bir tekrarlanacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Yani bir çiçek üzerinde melezleme yapılan çiçek harici diğerleri bitkiden uzaklaştırılmıştır. Bir bitkide toplamda 3 dölde 1'er tane çiçekte melezleme yapılmış olup diğer çiçekler bitkiden uzaklaştırılmıştır. Bu melezleme yapılan çiçekler 3. güne kadar her gün polinasyon işlemine tabi tutulmuşlardır. Bunun sebebi ise melezlemelerde meyve tutumunun oranını yükseltmektir.



**Şekil 3.8.** ♀M3-9 × Ticari♂ ve oluşan meyvesi, ♀Ticari × M3-9♂ ve oluşan meyvesi

Yapılan melezlemeler sonucunda F<sub>1</sub> tohumlarını taşıyan meyveler oluşmuştur. Oluşan meyveler hasat zamanına gelince GOÜ biyoteknoloji serasında hasat edilip GOÜ Ziraat Fakültesi Fitopatoloji bölümüne tohumları çıkarılmak amacıyla getirilmiştir. Tohumlar çıkarıldıktan sonra kurutma kağıtları üzerinde 2-3 gün kurutulmuşlardır. Kuruyan tohumlar 1.5 ml'lik ependorf tüplerine aktarılmıştır. Bütün meyvelerin hasadı beklenene kadar ilerde çalışmada kullanılmak amacıyla buzdolabında +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.2.2. Melezlemelerden Elde Edilen F<sub>1</sub> Tohumlarının Yetiştirilmesi ve F<sub>2</sub> Tohumlarının Elde Edilmesi

Melezlemelerden elde edilen ve +4 °C'de muhafaza edilen F<sub>1</sub> tohumları 3.2.1.'de belirtildiği gibi GOÜ biyoteknoloji serasında yetiştirilmiştir. Fide döneminde 2-3 gerçek yapraklı döneme geldiğinde yine 3.2.1.'de belirtilen eşit miktarlardaki karışım içersine saksılara şaşırtılmıştır.

Generatif olgunluğa gelen bitkilerin çiçekleri henüz açmadan yabancı döllemeyi önlemek amacıyla çiçekler parşomen kağıdıyla kapatılmıştır. Bu sayede hem yabancı dölleme önlenmiş olup hem de kendileme işlemi kontrollü bir şekilde

gerçekleştirilmiştir. Her bitkide 3 döl parşomen kağıdına alınıp üzerleri etiketlenmiştir. Bitkilerde 3 dölün parşomen kağıda alınma sebebi bitkinin daha fazla dölü saksı içinde büyütemeyeceği ve içersinde tohum oluşturamadığı içindir. Gelişime bırakılan meyveler hasat dönemine varıncaya kadar sera içersinde hastalık ve zararlılara karşı ilaçlı mücadeleye devam edilmiştir. Ayrıca bitkilerin kendilerini daha iyi toplayabilmesi için mikro-makro besin elementleri takviyesi yapılmış olup en verimli şekilde tohum alımı sağlanmıştır.

Parşomen kağıdı içersinde döllenmiş meyveler belirli bir olgunluğa geldiğinde dışındaki parşomen kağıdı çıkarılmış ve olgunlaşması beklenmiştir (Şekil 3.9.). Olgunlaşmış meyvelerden tohumlar 3.2.2.1.'deki gibi hasat edilmiştir. Haritalama çalışmasında kullanılmak üzere +4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.



**Şekil 3.9.** F<sub>2</sub> tohumlarını taşıyan kendilenmiş domatesler

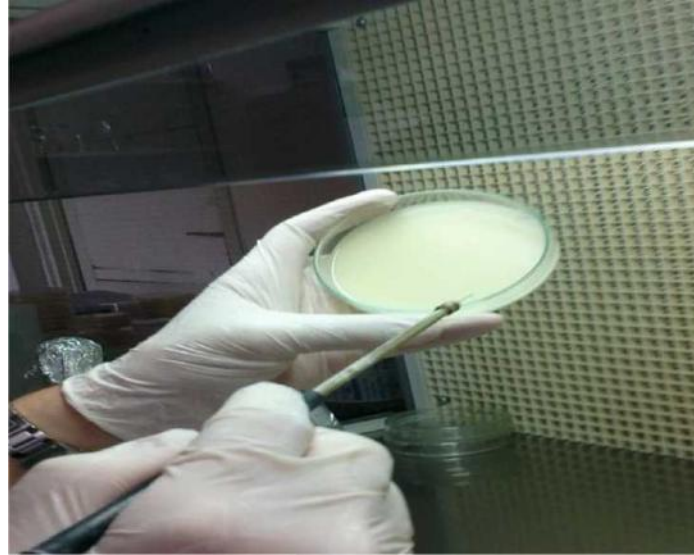
### **3.2.3. F<sub>1</sub> ve F<sub>2</sub> Popülasyonu Domates Bitkilerinde Patojenisite Testi**

Mezleme işlemleri gerçekleştirildikten sonra elde edilen meyvelerin bizim istediğimiz meyveler olup olmadığını kontrol etmek amacıyla patojenisite testleri yapılmıştır. Bu testlerde anne mutant M3-9 baba ticari (♀M3-9 x Ticari♂) melezleri kullanılmış olup bunlarda patojenisite testi sonucunda doğru olup olmadığına karar vermek kolay olacaktır. Bunun sebebi ise dayanıklılığın çekinik (resesif) karakterde bir gen tarafından kontrol edilmesidir. Ayrıca daha önceden mutant x mutant ve mutant x ticari melezleri testlere tabi tutulmuş olup F<sub>1</sub> bitkilerinin hassas karakter göstermesinden dolayıdır.

Yapılan bu patojenisite testi sadece hassaslık ya da dayanıklılık açısından değil çalışmanın ilerlemesinde emin adımlarla yürünmesini kesinleştirdiği için önem arz etmektedir. Yapılan patojenisite testi sonuçları yapılan melezlemelerin ♀M3-9 x Ticari♂ F<sub>1</sub> popülasyonunun doğruluğu açısından önemli olup bunu ortaya koyacaktır.

Patojenisite testlerinin yapılabilmesi için F<sub>1</sub> ve bu F<sub>1</sub>'ler içerisinde ♀M3-9 x Süvari♂ F<sub>1</sub> popülasyonundan elde edilen F<sub>2</sub> (haritalama) popülasyonları 3.2.1.'daki gibi sera ortamında yetiştirilmiştir. F<sub>1</sub> bitkileri öncelik olarak ekildikten sonra 2 gruba ayrılmıştır. Bu gruplardan birisi kendilenmesi sağlanarak F<sub>2</sub> tohumlarını oluşturmak için kullanılırken diğer grup patojenisite testlerine tabi tutulmuştur.

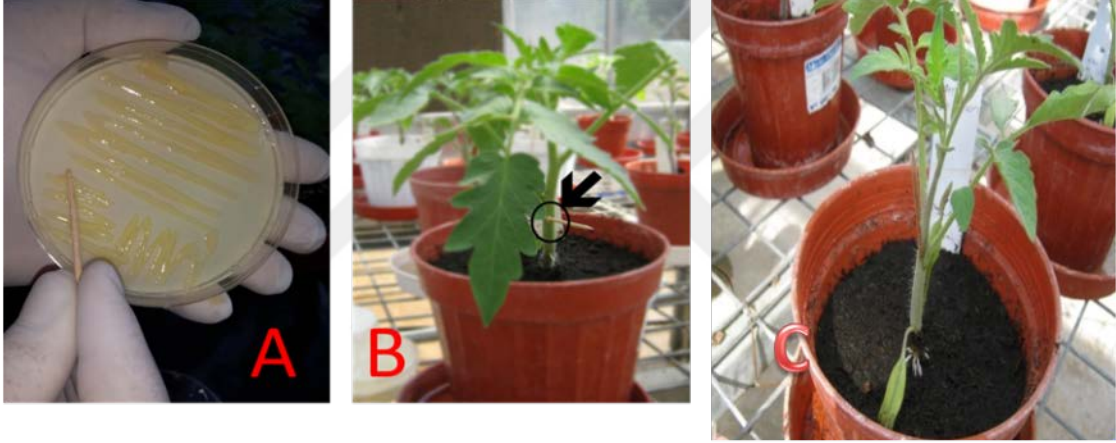
Patojenisite testi yapmak için bakteriyel kanser ve solgunluk hastalık etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in domateste en yıkıcı ırkı olan *Cmm2* önceden hazırlanan steril besi yeri olan GYCA'da 3'lü ve 4'lü çizimleri yapılarak geliştirilmiştir. -20 °C'de stokta bulunan bakteriler steril kabin içerisinde eritildikten sonra önce kabinin %70'lik etil alkol ile steril edilmesiyle GYCA besi yerlerine çizimleri yapılmıştır (Şekil 3.10.).



**Şekil 3.10.** Bakterilerin GYCA besi ortamına steril kabinde çizilmesi

Steril kabinde çizimi yapılan bakteriler daha sonra petri kaplarının hava almasını ve bulaşmayı engellemek amacıyla etrafı parafilm ile sarılmıştır. Etrafı parafilm ile sarılan petri kapları 3 gün boyunca +28 °C’de inkübatörde gelişimi beklenmiştir.

GYCA besi yerinde *Cmm2* ırkı geliştirildikten sonra F<sub>1</sub> popülasyonu domates bitkilerinin 4-5 gerçek yapraklı döneme geldikleri zaman steril kürdan yardımıyla gövdeye kök boğazının üstünden iliştilerle mekanik inokulasyonu (Şekil 3.11.) gerçekleştirilmiştir (Yıldız, 2007). Kontrol olarak steril kürdanlar steril dH<sub>2</sub>O (saf su) ile muamele edilmiş ve bitkilerin bazılarının kök boğazı üstüne iliştilerle kontrol grubu oluşturulmuştur (Şekil 3.11.).



**Şekil 3.11.** Hastalık etmeni patojenin gelişimi (A), bitkilerin gövdesine mekanik inokulasyon (B), kontrol grubu bitkiler (C)

F<sub>2</sub> haritalama popülasyonu olarak ♀M3-9 x Süvari♂ F<sub>1</sub> bitkilerinin kontrollü olarak kendileme sonucu oluşturulan F<sub>2</sub> popülasyonu kullanılmıştır. Bu F<sub>2</sub> popülasyonunu oluşturan tohumlar 3.2.1.’de belirtildiği şekilde yetiştirilmiştir. 3-4 gerçek yapraklı dönemde 3.2.1.’de belirtilen eşit orandaki yetiştirme ortamları bulunan steril saksılara şaşırtılmıştır. Haritama popülasyonu olan ♀M3-9 x Süvari♂ F<sub>2</sub> bitkilerine çalışmada karışıklık olmaması için F.Ö.1, F.Ö.2,... F.Ö.80 şeklinde isimlendirme yapılmıştır. F<sub>2</sub> haritalama popülasyonunu oluşturacak olan 80 bitki yetiştirilmiştir. Bunların yanında bu popülasyonu elde etmede kullanılan ebeveyn M3-9 ve Süvari bitkileri de aynı koşullar altında yetiştirilmiştir (Şekil 3.12.).



**Şekil 3.12.** Ebeveyn anne M3-9 (A), baba Süvari (B) ve ♀M3-9 x Süvari♂ F<sub>2</sub> popülasyonu kodlanan bitkileri (C)

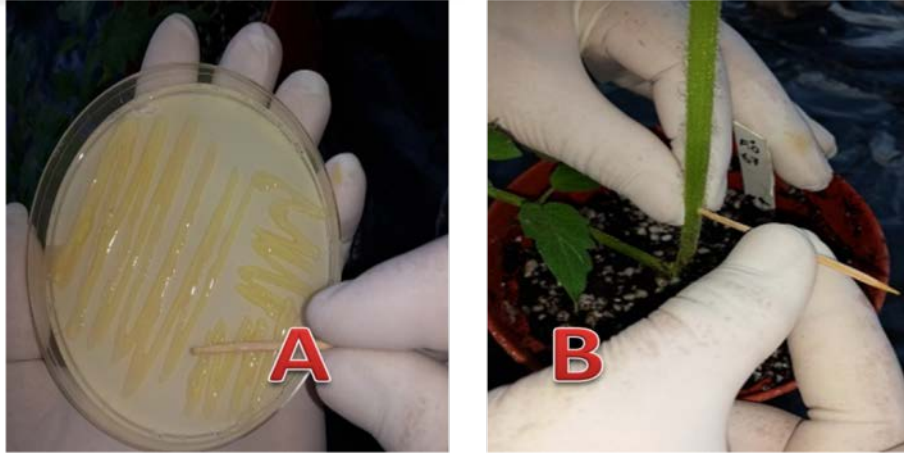
F<sub>2</sub> bitkilerine inokulasyon hemen gerçekleştirilmemiştir. Bunun sebebi haritalama popülasyonunda her bitkinin genetik yapısının birbirinden farklı olabileceği için yapılan patojenisite testi ile bitkilerin ölümü riskini almamaktır. F<sub>2</sub> popülasyonunda patojenisite testleri klonlanmış olan bitkilerde yapılmıştır. Bitkiler belli büyüklüğe gelip koltuk verdiği zaman bu koltuklar bitkilerden steril bistüri yardımıyla kesilerek alınmıştır. Alınan koltukların hepsi ayrı kaplarda üzerleri etiketlenerek steril su içerisinde köklendirilmiştir.

Bütün bu yapılan işlemlerdeki ana amaç haritalama popülasyonunda *Cmm2* patojen ırkına karşı direnç göstermeyen bitkilerin inokulasyon sonrasında hemen ölmesinin önüne geçmektir. Böylece yapılacak olan PCR analizleri için gerekli olan DNA bitkilerden daha rahat bir şekilde temin edilebilmiştir. Köklenen koltuklar 3.2.1.'da belirtilen toprak, torf, perlit ve yanmış hayvan gübresi karışımının önceden steril edilmiş ve doldurulmuş saksılara şaşırtılmıştır (Şekil3.13.).



**Şekil 3.13.** F<sub>2</sub> haritalama bitkilerindeki koltuk gelişimi (A), alınan koltukların köklendirilmesi (B), köklenen klon bitkilerin saksılara şaşırtılması (C)

♀M3-9 x Süvari♂ F<sub>2</sub> haritalama bitkilerinden genetik olarak aynı özellik gösterecek olan klonların alınmasıyla elde edilen bitkiler saksılara şaşırtıldıktan sonra 4-5 gerçek yapraklı dönemleri takip edilmiş ve GYCA besi ortamında yetiştirilen bakteriyel kanser hastalık etmeni *Cmm2* ile inokulasyonları 3.2.3.'nin başında belirtildiği şekilde yapılmıştır (Şekil 3.14.).



**Şekil 3.14.** F<sub>2</sub> popülasyonunda patojenisite testinin yapılması

#### **3.2.4. F<sub>1</sub> ve F<sub>2</sub> Domates Popülasyonlarından Patojenin Geri İzolasyonu ve DNA İzolasyonu**

Patojenisite testleri sonucunda F<sub>1</sub> ve F<sub>2</sub> bitkilerinde 1 ay sonrasında fenotipik skorlamalar yapılmıştır. Skorlamalar sonucunda bakteriyel kanser hastalık etmeni

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in domateste en fazla semptomu oluşturan ve zarar veren ırkı olan *Cmm2* hastalık semptomlarını bitkilerde göstermiştir. Bitkilerde solgunluk, yapraklarda nekrozlar görülürken iletim demetleri açıldığında ise renk değişimleri ve boşalmalar gözlemlenmiştir. F<sub>2</sub> popülasyonlarında ise bazı bitkilerin hastalığa karşı direnç gösterdikleri ve herhangi hastalık semptomlarına rastlanmadığı gözlemlenmiştir. Bu belirtilerin *Cmm2* patojeninden mi kaynaklandığı yoksa çevresel koşullar ya da başka bir hastalık etmeninden dolayı mı kaynaklandığını belirlemek için bitkilerin gövdelerinden örnekler alınmıştır.

Örnekler GOÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Anabilim dalı Fitopatoloji bölümünde steril kabin içinde pamukla %70'lik alkolle temizlenmiştir. Temizlenen örneklerden alınan kesitler yine steril kabin içersinde steril havanlarda dövülerek öz suyu çıkartılmıştır. Çıkarılan bitki öz suyu King-B besi yerine öze yardımıyla 3'lü ve 4'lü çizimleri yapılmıştır. Bitki öz suyu aktarılan petrilerin kenarları parafilm ile kapatılıp hastalık etmeninin en iyi gelişme sıcaklığı olan 28 °C'de inkübatöre alınmıştır (Şekil 3.15.).



**Şekil 3.15.** Besi ortamına bitki öz sularının aktarılması (A) ve inkübatöre konulması (B)

♀M3-9 x Süvari♂ F<sub>1</sub> ve F<sub>2</sub> popülasyonlarından geri izolasyonu yapılip inkübatörde geliştirilen bakteriler daha sonra tekrar 3. ve 4. bölgeden 1 öze dolusu alınarak yeniden King-B besi yerinde saflaştırılmıştır. Saflaştırılan bakterilerden ilerde PCR ile spesifik markörler (Çizelge 3.3.) yardımıyla teyit edilmesi için hem orijinal

*Cmm2*'nin hem de King-B besi yerinde geliştirilen bakterilerden Nejat ve ark., (2009)'ın belirttiği gibi toplam genomik DNA'ları çıkarılmıştır. Yöntemin prosedürü aşağıdaki şekildedir;

1. Bakteri izolatları 9 ml Nutrient Broth (Ek-B) sıvı besi yerine aşılanarak 200 dev./dk. çalkalayıcıda gece boyu  $27 \pm 1$  °C' de geliştirilmiştir.
2. Bakteri süspansiyonundan 1 mililitre steril ependorf tüpüne alınmış ve tüpler 15.000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiştir.
3. Pelet alınarak süpernatant ortam dışına atılmıştır. Ependorfta bulunan peletin üzerine 600 µl CTAB (Ph:8.00) (Ek-B) eklenerek vortekslenmiştir.
4. Tüpler içindeki solüsyonla 65 °C' deki su banyosunda yarım saat bekletilmiştir.
5. Banyodan alınan her bir tüpe 600 µl Cloroform isomil alkol eklenmiş ve 1'er dk vortekslenmiştir.
6. 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılarak üst kısma çıkan süpernatant içinde DNA yeni ependorf tüp içine aktarılmıştır. Tüplere 600 µl derin dondurucuda -20 °C'de soğutulmuş isopropanol eklenmiştir. Tüpler derin dondurucuda (-20 °C) 45 dk. bekletilmiştir.
7. 12.000 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiştir.
8. Üst sıvı kısım dikkatlice dökülmüş ve -20 °C'de soğutulmuş % 70'lik alkolden 1000 µl tüplere eklenmiştir. 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapılarak alkolle yıkama yapılmıştır.
9. Ependorf tüpler ters çevrilere alkol dökülmüş ve steril kabinde 1 saat kurumaya bırakılmıştır.
10. Ependorf tüpler içerisine 30 µl TE Buffer (Ek-B) koyulmuştur. İzole edilen DNA'lar PCR amplifikasyonlarında kullanılmak amacı ile -20 °C'de muhafaza edilmiştir.
11. DNA örneklerinin izole edilip edilmediği %1'lik agarose jelde jel elektroforez sisteminde görüntülenerek DNA örneklerinin izole edildiği teyit edilmiştir.

Bu yöntemde 1 ve 2 numaralı adımları bakterilerin yoğunluğunun çok az olduğu durumlarda uygulanması daha uygundur. Eğer bakteriler yeteri derecede gelişmiş ise 1 ve 2 numaralı adımlar izlenmeden direk 3 numaradan başlanılarak devam edilebilir.

### 3.2.5. Kalıtım Derecesinin Belirlenmesi

Haritalama çalışması yapılabilmesi için 80 tane F<sub>2</sub> bitkisi yetiştirilmiş olup bu bitkiler hatalık etmeni *Cmm2* patojeniyle patojenisite testlerine tabi tutulmuştur. Patojenisite testleri sonucunda bitkilerde meydana gelen semptomlara bakılarak bitkiler fenotipik olarak 0-5 skalasına göre değerlendirilip skorlanmıştır. Skorlamalardan elde edilen tablo ile istatistiki analiz yapılmıştır. İstatistiki Khi-Kare (X<sup>2</sup>) (Şekil 3.16.) testi uygulanarak analizler yapılmıştır.

$$\chi^2 = \sum \frac{(G - B)^2}{B}$$

Şekil 3.16. Khi-Kare (x<sup>2</sup>) testi formülü

### 3.2.6. F<sub>2</sub> Haritalama Popülasyonu Bitkilerden DNA İzolasyonu

♀M3-9 × Süvari♂ F<sub>2</sub> haritalama popülasyonu bitkilerinde inokulasyon sonucu elde edilen semptomlar göz önünde alınarak hastalığa dirençli (dayanıklı) ve direnç göstermeyen (hassas) bitkiler skorlanmıştır. Skorlanan bitkiler içersinden hastalığa karşı en dirençli ve en dirençsiz bitkiler seçilmiştir. Sambrook ve ark. (1989)'nın yapraktan DNA izolasyon yönteminin modifiye edilmiş şekliyle saf DNA'lar elde edilmiştir. DNA izole etme işlemi sırasında proteinleri parçalamak için Proteinaz K, RNA'ları parçalamak içinse RNase adı verilen enzimler kullanılmıştır. Kloroform/isoamylalkol 24:1 oranında ortamda parçalanmış proteinleri, hücre içeriğini ve RNA parçalarını uzaklaştırmak için kullanılmıştır. Aşağıda protoklün aşamaları verilmiştir.

#### **DNA izolasyon protokolü:**

- 1,5-2 cm boyundaki yaprak örneklerinin her biri öncelikle sıvı nitrojen kullanılarak ependorf tüp içerisinde toz hale gelecek şekilde ezilir. Daha sonra her tüpe 500 µl buffer (Ek-B) ilave edilir.
- Ependorf tüplerinde bulunan her örneğe bir ünite Proteinase - K eklendikten sonra (1 ünite 5 µl konsantrasyon) vortekste 1 dk. karıştırılır.

- 40 µl %20 SDS (veya 80 µl %10 SDS) (Ek-B) eklenir. Örnekler alt üst edilerek iyice karıştırılır. SDS'den sonra vorteks kullanılmaz. Su banyosunda 65°C'de 2 saat bekletilir. 15 dakikada bir alt üst edilerek iyice karışması sağlanır.
- Tüpler su banyosundan çıkarıldıktan sonra 5 dk. oda sıcaklığında soğuması beklenir. 2/3 hacim (400 µl) kloroform : isoamil alkol (24:1) eklenir. 10-15 dk. hafifçe alt üst edilir ve iyice karıştırılır.
- 10 000 rpm'de 15 dk. santrifüj edilir.
- Elde edilen süpernatant yeni bir ependorf tüpüne alınır. Süpernatant'a 400 µl soğuk 2-propanol eklenir. 1-2 dk. alt üst edilir. Bu işlemden sonra DNA gözle görülür.
- 10 000 rpm'de 15 dk. santrifüj edilir.
- Santrifüjden sonra üst kısımdaki sıvı dikkatlice dökülür. Tabanda kalan Pelet kurutulur. Pelet bulunan ependorfa 400 µl 1X TE eklenir. 4°C'de 1 gece dinlendirilir.
- 2. gün DNA 60 °C'deki su banyosunda 3 saat 15 dk.'da bir karıştırılarak eritilir.
- RNase (10 mg/ml) çözeltisinden 1 µl eklenir. 60 °C'deki su banyosunda 1 saat boyunca 15 dk.'da bir karıştırılarak bekletilir.
- Tüpe 400 µl kloroform: isoamil alkol (24:1) eklenir. Tüpler 10-15 dakika hafifçe alt üst edilir.
- 15 dk. 10 000 rpm'de santrifüj edilir.
- Süpernatant 100 µl 1,2 M (Molar) NaCl (veya 26 µl 5M NaCl ) (Ek-B) koyulan yeni tüpe alınır. Hafifçe karıştırılır.
- 800 µl %96 soğuk etil alkol eklenir. DNA alt üst edilip karıştırılarak çöktülür.
- 10 000 rpm'de 20 dk. santrifüj edilir. Üstteki sıvı dikkatlice dökülür.
- Pelet 1 200 µl %70 soğuk etil alkol ile hafifçe yıkanır. Alkol peletin olduğu yerin karşısına dökülmelidir. 200 µl'lik pipetle 200 µl'si ilk olarak sonra geri kalanı 1000 µl'lik pipetle dikkatlice dökülür. Yıkanan pelet ters çevrilerek 2 saat kurutulur.
- Kuruyan pelet 100 µl 1X TE'de çözülür. 1 gece 4°C'de çözünmesi beklenir. Diğer gün 65°C su banyosunda 3-4 saat eritilir. Toplam 20 µg civarında saf DNA elde edilebilir.

### 3.2.7. PCR Çalışma Metodu

PCR (Polymerase Chain Reaction veya polimeraz zincirleme tepkimesi), yeri bilinen belirli bölgeler arasındaki nükleik asit dizilerini markörler yardımıyla enzimatik olarak çoğaltılması işlemine verilen addır.

Metot kısaca suni olarak bir tüp içinde belirli bölgedeki nükleik asitlerin çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Bunun için kullanılan spesifik nükleik asit sırası bilinen genellikle 6-25 bp'lık markörler gerekmektedir. Bir çeşit klonlama olarak da bilinen PCR; 94-98 °C aralığında DNA'nın denatürasyonu ile başlar. 37-65 °C aralığında annealing (tavlama) ile primerlerin yapışmasıyla devam eder. 72 °C sıcaklıkta DNA uzamasına (extension) dayanan ve tekrar eden döngülerden oluşmaktadır. Bu üç devre istenilen döngü sayısı ayarlanarak defalarca istenilen bölgenin çoğaltılmasıyla birlikte milyonlarca DNA elde edilmesini sağlar. Bu işlem termal-cycl adını verdiğimiz bu üç devrenin gerek sıcaklık gerek gerçekleşme sürelerini ayarlamamızı sağlayan alet ile gerçekleştirilir (Anonim, 2016c)

PCR işlemi sırasında reaksiyonda bazı kimyasallar önemlidir. Tampon çözelti adını verdiğimiz kimyasal; ortamın tuz konsantrasyonunun optimum eder ve pH'yı düzenler. MgSO<sub>4</sub> ' e polimeraz enzimi ihtiyaç duyarken, A, T, G, C nükleotidlerinde DNA üretiminde kullanılır. Bu bahsedilen kimyasalların herhangi birinin eksik ya da istenilen konsantrasyon ve miktarda olmaması elde edilecek PCR ürünün ya hiç olmaması ya da istenilen görüntünün elde edilememesi gibi sonuçlar ile karşılaşmamıza neden olabilir. Çalışmada aksi belirtilmedikçe Çizelge 3.2.'te belirtilen konsantrasyonlar ve miktarlarda kullanılmıştır.

**Çizelge 3.2.** PCR amplifikasyonlarında kullanılan kimyasallar, konsantrasyonları ve miktarları

Kimyasal Madde	Final konsantrasyon	Miktar (mikrolitre= µl)
dsH <sub>2</sub> O	Ultra Saf	17µl
MgCl <sub>2</sub>	20 mM	4µl
Taq Buffer	10X	4µl
dNTP Mixture	2.5 mM	4µl
Primer 1	10 mM	4µl
Primer 2	10 mM	4µl
Taq Polimerase	0,5 U	1µl
DNA	50 ng/100	2µl
		<b>Toplam: 40 µl</b>

### 3.2.7.1. Bakteriyel Patojenin Moleküler Olarak Tanılanması

♀M3-9 × Süvari♂ F<sub>1</sub> ve F<sub>2</sub> popülasyonu domates bitkilerinde gerçekleştirilen patojenisite testleri sonucu hassas bitkilerin gövdelerinden bakteriler izole edilmiştir. İzole edilen bakterilerin DNA'ları izole edilerek spesifik primerler ile *Cmm* olup olmadığı tanılanmıştır. Bunun için Louws ve ark., (1999)'nın geliştirdikleri 614 bp büyüklüğünde bant oluşturan *CMM5* ve *CMM6* primer çifti kullanılmıştır.

**Çizelge 3.2.** Patojen tanımlanmasında kullanılan primerler

Primer	Baz Dizilim	Baz Büyüklüğü
<i>CMM5</i>	GCGAATAAGCCCATATCAA	614 bp
<i>CMM6</i>	CGTCAGGAGGTTCGCTAATA	614 bp

Kullanılan primer çiftleri ile yapılan PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen patojen bakterilerin *Cmm* olduğu tanısı kesin olarak koyulabilmiştir.

### 3.2.7.2. Haritalama Popülasyonu F<sub>2</sub>'de Moleküler Çalışmalar ve Kullanılan Markörler

Çalışmanın en önemli kısmını oluşturan laboratuvar çalışmalarında GOÜ Biyoteknoloji laboratuvarı alt yapısı kullanılmıştır. Yapılan F<sub>2</sub> popülasyonundaki lokus

haritalama çalışmalarında toplamda 120'in üstünde SSR ve INDEL markörleri kullanılmıştır (Çizelge 7.1., Çizelge 7.2. Ek-C'de verilmiştir). Yapılan çalışmada amaç fenotipteki dirençli (dayanıklı) ve direnç göstermeyen bitkileri genotipe skorlamaktır. PCR karışımları Sambrook ve ark., (1989)'nın o yıllarda belirttikleri protokolün modifikasyonu şeklinde oluşturulup optimize edilen koşullarda kullanılmıştır.

PCR amplifikasyonu için gerekli olan kimyasallar ve miktarları 3.2.7.1.'da çizelge 3.3.'te verilmiştir. Çalışmada kullanılan SSR ve INDEL markörlerinin özellikleri ve markörlerin çalışmalarda hangi özelliklere sahip olması gerektiği 2.2.'de anlatılmıştır.

### **3.2.7.3. PCR Ürünlerini Jel Elektrofrezde Görüntüleme**

Laboratuar çalışmalarında PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen PCR ürünlerini görüntülemek için jel elektrofrez sistemi kullanılmıştır. Sistemde – yönden + yöne bir elektrik akımı verilmekte olup bu akım içerisinde Ethidium Bromide boyar maddesi bulunan %3'lük metaphor jel ve %2'lik agarose jel içerisindeki PCR ürünü daha sonra bilgisayar ortamında görüntülenebilmektedir. Ayrıca izole edilen DNA örneklerinden gerçekten izolasyon gerçekleştirildi mi diye teyit etmek için %1'lik agarose jelde kullanılmıştır. Genellikle 60-100 voltluk bir elektrik akımı uygulanmaktadır. Metaphor ve agarose jellerin hazırlanış protokolü aşağıdaki gibidir.

- Hangi boy jel boxda yapılacağına göre jel box'ın alabildiği kadar dH<sub>2</sub>O ile birlikte 5 X TBE karışımı yapılır.
- -20 °C'de 15 dk. bekletilir.
- Tartılan Metaphore agarose, hazırlanan karışımın içine aktarılır ve 10 dk. ısıtıcılı mayetik karıştırıcıda balıkla karıştırılır.
- Terazide karışımın ilk kütlesine bakıldıktan sonra üzerine 100 dH<sub>2</sub>O eklenerek 15 dk. karıştırılır.
- Erlenmayerin üzeri streç filmle beraber kapatılır, 2-3 delik açıldıktan sonra mikrodalgada kaynamaya bırakılır.

- Mikrodalgada ilk kütlesine inene kadar 45 sn'de bir karıştırılarak kaynatılır.
- İlk kütlesine 20 g kalınca 85-90 °C arasında geldiğinde jel küvetinin kenarlarına silikon çekilir.
- İlk kütlesine indiğinde mikrodalga fırından alınır. Ethidium Bromide 85-90 °C arasındayken eklenir, yavaşça karıştırılır. Tamamen karışınca jel tankına dökülür.
- Oda sıcaklığında 75 dakika , +4 °C'de 30 dk. bekledikten sonra yükleme yapılabilir.
- Agarose jelde istenen dH<sub>2</sub>O ve 5 X TBE dolapta bekletilmeyerek direk olarak karışım hazırlanır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. F<sub>1</sub> Popülasyonunda Yapılan Patojenisite Testi Sonuçları

GYCA besi yerinde geliştirilen bakteriyel kanser hastalık etmeninin en yıkıcı ırkı olan *Cmm2* ile melezlemelerin doğruluğunu anlayabilmek amacıyla F<sub>1</sub> bitkilerine patojenisite testi yapılmıştır. İnokulasyondan sonraki 1 hafta bitkiler her gün kontrol edilmiştir. Bitkiler inokulasyondan sonraki 1 aya kadar düzenli bir şekilde sulamaları yapılmış kontrol edilmişlerdir. İnokulasyon sonrası her hafta hastalık semptomlarının varlığı gözlemlenmiş ve değerlendirilmiştir. Aynı doğrultuda kontrol grubu bitkiler kendilenmeye bırakılan bitkiler olup herhangi bir hastalık semptomu görülmemiştir.



**Şekil 4.1.** F<sub>1</sub> domates gövdelerinde kanser ve gövde içersi özün boşalması

İnokulasyon sonrası 2.haftadan itibaren bitkilerde fenotipik olarak gövdede kanserler gözlemlenmiştir. 1 ay sonrasında bitkilerin gövdeleri inokulasyon bölgesinin alt tarafından kesilerek üst bölgesinin simetrik olarak ikiye ayrılmasıyla açıldığında ise gövde özünün tamamen boşaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.1.)

### 4.2. F<sub>2</sub> Popülasyonunda Yapılan Patojenisite Testi Sonuçları

Melezlemeler sonucu oluşturulmuş olan haritalama popülasyonu genetik havuzu zenginleştirilen M3-9 mutant domates bitkisi ile ticari Süvari bitkisinden elde edilen ♀M3-9 × Süvari♂(F.Ö.) F<sub>2</sub> popülasyonudur. Bu F.Ö F<sub>2</sub> popülasyonundan patojenisite testleri yapmak ve fenotipteki hastalığa karşı direnç gösterimini genotipte skorlamak

için 80 tane bitki yetiştirilmiştir. Bu bitkiler patojen *Cmm2* ile inokulasyonu sonrasında 1. ay sonunda fenotipik skorlamalar yapılmıştır. Fenotipler skorlanırken Francis ve ark., (2001)'nin belirttiği 0-5 skalası kullanılmıştır. Bu skalaya göre;

0= Dirençli, bitkinin herhangi bir aksamında hastalık semptomu görülmeyen bitkiler ( Şekil 4.2.)

3= Orta hassas, bitkilerde solgunluklar ve gövdelerde kanserler, ( Şekil 4.2.)

5= Hassas, bitkilerde aşırı semptomlar ve bitkinin ölümü şeklindedir ( Şekil 4.4).

Bu belirtilen skalaya göre bitkiler gruplandırılmıştır. Aynı özellikleri taşıyan bitkiler bir çizelge oluşturularak orada belirtilmiştir. Çalışmalarda karışmayı önlemek ve kolaylık açısından ♀M3-9 × Süvari♂ F<sub>2</sub> bitkilerinin her biri 3.2.3.'de belirtildiği gibi ayrı ayrı 'F.Ö.' olarak adlandırılmıştır.



Şekil 4.2. F.Ö F<sub>2</sub> popülasyonu dirençli bitki fenotipik (A), dirençli bitki gövde kesiti (B), orta hassas bitki fenotip (C), orta hassas bitki gövde içi görünümü (D)



**Şekil 4.3.** F.Ö F<sub>2</sub> popülasyonu dirençsiz hassas bitkilerin fenotipik ve gövde kesitlerinden görünüşleri

F<sub>2</sub> (F.Ö.) popülasyonu bitkilere *Cmm2* patojeniyle inokulasyon yapıldıktan sonra 1 ay sonunda 0-5 skalasına göre skorlanan 23 adet dirençli, 19 adet hassas ve 38 adet orta derecede direnç gösteren bitkiler fenotip olarak skorlanmıştır. (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** ♀M3-9 X Süvari♂ (F.Ö.) F<sub>2</sub> popülasyonunda koltuk alınarak yetiştirilen domates bitkilerinin *Cmm2* ile inokulasyonundan sonraki 1 ay sonunda 0-5 skalasına göre değerlendirilmesi.

Bitki ismi	0-5 skalası değerleri		
	Dayanıklı = 0	Orta dayanıklı = 3	Hassas = 5
F.Ö.1	x		
F.Ö.2		x	
F.Ö.3			x
F.Ö.4		x	
F.Ö.5		x	
F.Ö.6		x	
F.Ö.7	x		
F.Ö.8			x
F.Ö.9	x		
F.Ö.10		x	
F.Ö.11			x
F.Ö.12		x	
F.Ö.13			x
F.Ö.14			x
F.Ö.15		x	
F.Ö.16	x		
F.Ö.17		x	
F.Ö.18		x	
F.Ö.19		x	
F.Ö.20		x	

**Çizelge 4.1. (Devam)** ♀M3-9 X Süvari♂ (F.Ö.) F<sub>2</sub> popülasyonunda koltuk alınarak yetiştirilen domates bitkilerinin *Cmm2* ile inokulasyonundan sonraki 1 aysonunda 0-5 skalasına göre değerlendirilmesi.

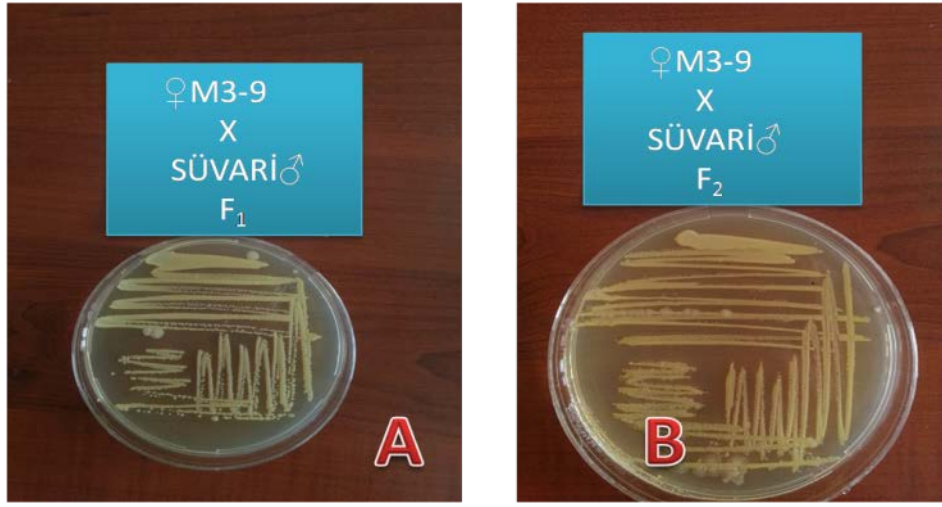
Bitki ismi	0-5 skalası değerleri		
	Dayanıklı = 0	Orta dayanıklı = 3	Hassas = 5
F.Ö.21		x	
F.Ö.22			x
F.Ö.23	x		
F.Ö.24		x	
F.Ö.25		x	
F.Ö.26	x		
F.Ö.27			x
F.Ö.28	x		
F.Ö.29			x
F.Ö.30		x	
F.Ö.31	x		
F.Ö.32		x	
F.Ö.33			x
F.Ö.34	x		
F.Ö.35		x	
F.Ö.36		x	
F.Ö.37		x	
F.Ö.38			x
F.Ö.39		x	
F.Ö.40		x	
F.Ö.41	x		
F.Ö.42		x	
F.Ö.43			x
F.Ö.43			x
F.Ö.44	x		
F.Ö.45			x
F.Ö.46	x		
F.Ö.47	x		
F.Ö.48			x
F.Ö.49		x	
F.Ö.50	x		
F.Ö.51	x		
F.Ö.52		x	
F.Ö.53		x	
F.Ö.54			x
F.Ö.55		x	
F.Ö.56		x	
F.Ö.57		x	
F.Ö.58			x
F.Ö.59		x	
F.Ö.60	x		
F.Ö.61		x	

**Çizelge 4.1. (Devam)** ♀M3-9 X Süvari♂ (F.Ö.) F<sub>2</sub> popülasyonunda koltuk alınarak yetiştirilen domates bitkilerinin *Cmm2* ile inokulasyonundan sonraki 1 aysonunda 0-5 skalasına göre değerlendirilmesi.

Bitki ismi	0-5 skalası değerleri		
	Dayanıklı = 0	Orta dayanıklı = 3	Hassas = 5
F.Ö.62		x	
F.Ö.63		x	
F.Ö.64	x		
F.Ö.65			x
F.Ö.66	x		
F.Ö.67		x	
F.Ö.68		x	
F.Ö.69	x		
F.Ö.70			x
F.Ö.71		x	
F.Ö.72	x		
F.Ö.73		x	
F.Ö.74			x
F.Ö.75	x		
F.Ö.76	x		
F.Ö.77		x	
F.Ö.78			x
F.Ö.79		x	
F.Ö.80	x		

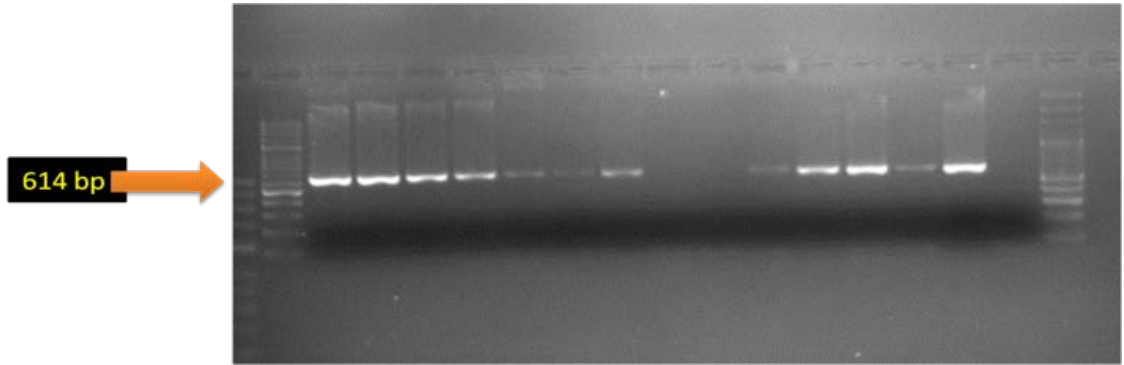
#### 4.3. F<sub>1</sub> ve F<sub>2</sub> Popülasyonlarından İzole Edilen Bakterilerin PCR İle Tanılanması

F<sub>1</sub> ve F<sub>2</sub> popülasyonlarında hastalık semptomlarının bizim etmenimiz olan *Cmm2*'den mi kaynaklı yoksa başka bir etmenden dolayı mı olduğunu teyit etmek amacıyla gövdelerden alınan örnekler 3.2.4.'de belirtildiği gibi King-B besi yerinde geliştirilmiştir (Şekil 4.4.). Geliştirilen bakterilerden toplam genomik DNA çıkarılmıştır. Aynı zamanda pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere orijinal *Cmm2* patojeninin de DNA'sı çıkarılmıştır. Yapılan PCR amplifikasyonları sonucunda geri izole edilen bakteri DNA'ları ile orijinal bakteri olan *Cmm2*'nin DNA'ları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.5.).



**Şekil 4.4.** F<sub>1</sub> ve F<sub>2</sub> bitkilerinden geri izole edilen bakteri gelişimleri

King-B besi yerinde geliştirilen bitkilerden geri izole edilen bakterilerden PCR amplifikasyonu gerçekleştirmek için DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonucunda *Cmm* patojenine spesifik *CMM5* ve *CMM6* primer çiftinin oluşturduğu 614 bp'lik bant oluşumları ile izole edilen bakterilerin *Cmm* olduğu tanısı kesin bir şekilde ortaya koyulmuştur (Şekil 4.5.) (Çizelge 4.2.).



**Şekil 4.5.** ♀M3-9 X Süvari♂ F<sub>1</sub> ve F<sub>2</sub> bitkilerinden elde edilen bakterilerin orijinal *Cmm2* ile oluşturduğu 614 bp'lik bantlar (Örnekler Çizelge 4.2.'de açıklanmıştır)

**Çizelge 4.2.** ♀M3-9 X Süvari♂ F<sub>1</sub> ve F<sub>2</sub> popülasyonu domates bitkilerinde inokulasyon sonrası gövdeden izole edilen patojenlerin *CMM5* ve *CMM6* primerleri kullanılarak yapılan PCR amplifikasyonu sonuçlarının değerlendirilmesi

Örnek Numarası	Örnek	Sonuç
1	Pozitif Kontrol (1)	+
2	♀M3-9 X Süvari♂ F <sub>1</sub>	+
3	F.Ö.7	+
4	F.Ö.42	+
5	F.Ö.15	+
6	F.Ö.23	+
7	F.Ö.56	+
8	F.Ö.73	+
9	F.Ö.6	+
10	F.Ö.64	+
11	F.Ö.18	+
12	F.Ö.29	+
13	F.Ö.33	+
14	F.Ö.38	+
15	F.Ö.1	+
16	Negatif kontrol (su )	-

#### 4.4. Kalıtım Derecesinin F<sub>2</sub> Popülasyonunda Belirlenmesi

Haritalama popülasyonu olan F.Ö. F<sub>2</sub>'de 80 bitki yetiştirilmiş olup bu bitkiler domateste bakteriyel kanser hastalığına neden olan *Cmm2* izolatu ile patojenisite testine sokulmuşlardır. Patojenisite testlerinden elde edilen fonotipik skorlamalar yapıldıktan sonra 4.2.'de belirtildiği gibi tablo oluşturulmuştur. F.Ö. haritalama popülasyonunda oluşturulan tablonun değerlerine göre istatistiki analizler kalıtım derecesini ortaya koymak amacıyla yapılmıştır. Kalıtım derecesinin ortaya konmasında analiz yöntemi olarak  $X^2$  (Khi-Kare) testi uygulanmıştır (Çizelge 4.3.).

F.Ö. popülasyonunda 80 tane haritalama bitkisinden fenotipte 23 adet bitki hastalığa karşı direnç göstermiş, 38 adet bitki hastalığa karşı orta direnç (orta hassas) göstermiş ve son olarak 19 adet bitki ise hastalığa karşı herhangi bir direnç göstermemiş yani hassas olarak skorlanmıştır. Toplam olarak fenotipte 57 hassas 23 dirençli bitki gözlemlenmiştir. Bu oranların arasında farkın bu derece çok olması ise resesif

karakterdeki gen tarafından bitkilerde direnç oluşmasıdır. Bu genin resesif karakterde olması sebebiyle fenotipte F<sub>2</sub> bitkilerinde %25 oranında direnç gösteren bitki gelmesi beklenirken %75 oranında hassas bitkilerin klasik Mendel kurallarına göre bu şekilde olması beklenmektedir. Yani diğer bir deyişle yetiştirilen 80 bitkiden fenotipte 60 bitkinin hastalığa direnç göstermezken 20 bitkinin hastalığa karşı direnç göstermesi beklenmektedir.

$X^2$  değeri (beklenen bitkiler-gözlenen bitkiler)<sup>2</sup> / beklenen bitkiler formülüyle her durum için hesaplanmaktadır. Haritalama popülasyonunda gözlemlenen değerler ele alındığında toplam  $X^2$  değeri direnç gösteren ve göstermeyen bitkiler için 0.060 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3.).

**Çizelge 4.3.** F<sub>2</sub> popülasyonunda yapılan patojenisite testine göre 0-5 skalasına göre değerlendirilen bitkilerin kalıtım derecesinin khi-kare testi ile değerlendirilmesi.

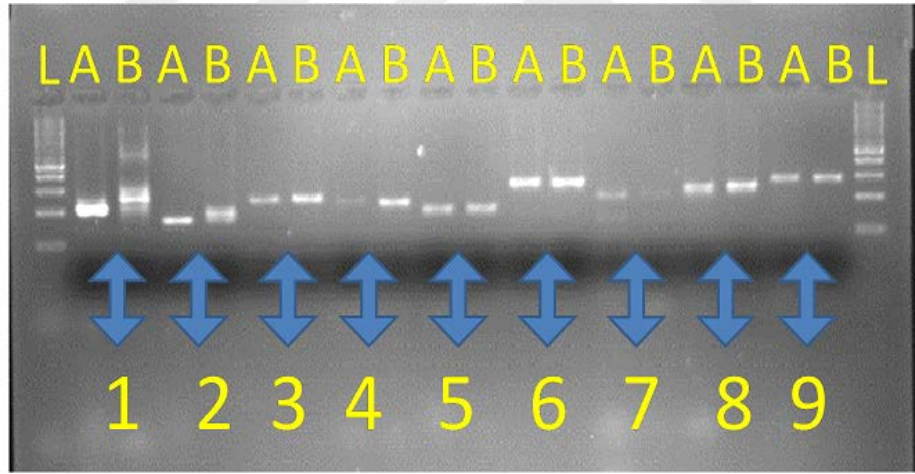
<b>Fenotipik Reaksiyonlar</b>	<b>Gözlemlenen (G)</b>	<b>Beklenen (B)</b>	<b>Sapma (G-B)</b>	<b><math>\chi^2</math> (G-B)<sup>2</sup>/B</b>
Dayanıklı	23	20	+3	0,045
Hassas	57	60	-3	0,015
Toplam	80	80	0	0,060

Yapılan haritalama çalışmasındaki değişkenlerde 2 tane varyans bulunmakta olup bu varyanslar hastalığa karşı direnç gösteren ve direnç göstermeyen hassas bitkilerdir. Fakat bu varyansların eksikliği ise  $X^2$  testlerinde serbestlik derecesinin olmamasıdır. . Bu nedenden dolayı haritalama çalışmasında direnç gösteren ve direnç göstermeyen fenotiplerin toplamdaki serbestlik derecesi (degree of freedom: d.f) bir kabul edilip bu d.f derecesinde bulunmakta olan  $X^2$  değeri araştırılacaktır.  $X^2$  tablosu incelendiğinde ise 0.900 değeri olan 0.015'ten büyük olması kalıtımın çevreden dolayı olacağı hipotezini reddetmiştir. Hastalığa karşı direncin resesif bir gen tarafından kontrol edildiği ve bu genin klasik Mendel kurallarına göre sonraki nesillere geçtiği anlaşılmaktadır. Yani istatistiki olarak ( $\chi^2=0.060$ ; d.f = 1) şeklinde  $X^2$  değeri ve serbestlik derecesi gösterilir. Bilimsel olarak yazılan ve yayınlanan makalelerde bu değer parantez içersinde gösterilir. Yapılan çalışmada beklenen değerlerle gözlemlenen

değerlerin çok yakın olması bu durumun genetik olarak bitkilerden bitkilere geçtiğini veyahut genetikten dolayı kaynaklandığı rahatça söylenebilir.

#### 4.5. F.Ö. (♀M3-9 X Süvari♂ ) F<sub>2</sub> Popülasyonunda Haritalama Sonuçları

Bakteriyel kanser hastalığını oluşturan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in domatesteki en fazla semptom oluşturan ve zarar veren ırkı olan *Cmm2* hastalık etmenine dayanıklı olarak bulunan M3-9 ümitvar mutant domates bitkisi ile ticari hibrit çeşit Süvari melezlerinden oluşan ♀M3-9 X Süvari♂ F<sub>2</sub> popülasyonunda haritalama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Öncelikle ♀M3-9 X Süvari♂ F<sub>1</sub> popülasyonu oluşturulmuştur. Haritalamanın gerçekleştirildiği F<sub>2</sub> popülasyonu 3.2.2.2.'de belirtildiği gibi elde edilmiştir. Yaklaşık olarak 120'den fazla SSR ve INDEL markörleriyle yapılan çalışmada bitkiler arasındaki polimorfizme bakılmıştır. Polimorfizmlerin görülebilmesi için PCR ürünleri %3'lük metaphor jelde görüntülenmiştir (şekil 4.6.).



**Şekil 4.6.** Mutant M3-9 domates bitkisi ile hassas Süvari domates bitkisinde PCR amplifikasyonu sonucunda %3'lük metaphor jelde 100 bp'lik lader kullanılarak polimorfizmin araştırılması. (L:100 bp'lik Lader, A: M3-9, B: Süvari, 1: TGS2121, 2: SL20210\_883i, 3: SSR65, 4: SSR333, 5: SSR231, 6: SSR350, 7: TOM202, 8:SSR45, 9: TGS986 )

M3-9 domates bitkisiyle Esin domates bitkisi arasında polimorfizm araştırmasında %3'lük metaphore jelde koşturulan PCR ürünlerinden elde edilen bantların 100 bp'lik lader kullanılarak Bio Capt programında hesaplanmasıyla polimorfik primerler belirlenmiştir (Çizelge 4.4.).

**Çizelge 4.4.** Anne ve baba bitkilerde polimorfik olarak bulunan primerlerin oluşturduğu bantların % 8'lik hata payı ile Bio Capt programında hesaplanması

Kromozom	Marker	Baz Dizilimi	Kromozom daki Yeri	Baz Büyüklüğü
3	TGS2121	<b>Forward primer (5'-3')</b> GTTGAATATGCGAAACCGTCT <b>Reverse primer (5'-3')</b> CAATGTGAGACTTCTTGGCG	59.57 cM	M3-9: 207 bp Süvari:258 bp Baz farkı:51 bp
5	SL20210_883i	<b>Forward primer (5'-3')</b> GAGGTATCAAAGTTATGCTTTCAC <b>Reverse primer (5'-3')</b> TCGATTAGTTGAGCTAGTTATTCC	45.50 cM	M3-9: 166 bp Süvari:185 bp Baz farkı:19 bp
2	SSR96	<b>Forward primer (5'-3')</b> GTTCCCGCTTGAGAAACAAC <b>Reverse primer (5'-3')</b> CCAATGCTGGGACAGAAGAT	36,50 cM	M3-9: 222 bp Süvari:216 bp Baz farkı:6 bp
1	TOM202	<b>Forward primer (5'-3')</b> TGGTCACCTTCAACTTTTATAC <b>Reverse primer (5'-3')</b> AAATGATAATGAAATGGAGTGA	?	M3-9: 231 bp Süvari:240 bp Baz farkı:9 bp
9	SSR69	<b>Forward primer (5'-3')</b> GGGTCTCAAAGAAATGGCAC <b>Reverse primer (5'-3')</b> ACGGATCTCAGCCTCAGAAA	24,90 cM	M3-9: 212 Süvari:218bp Baz farkı:6 bp
3	SSR27	<b>Forward primer (5'-3')</b> CCCAAATCAAGGTTTGTGGT <b>Reverse primer (5'-3')</b> TCAGATGCCACCACTCTCAG	169,00 cM	M3-9: 172 bp Süvari:168 bp Baz farkı:4 bp
5	TGS986	<b>Forward primer (5'-3')</b> GGGTTATCAATGATGCAATGG <b>Reverse primer (5'-3')</b> CCTTATGTCAGCCGGTGT	116.22 cM	M3-9: 288 bp Süvari:300 bp Baz farkı:12 bp

TGS2121 moleküler markörü hastalığa direnç gösteren M3-9 domates bitkisinde 207 bp'lik bant oluşturmuşken, Süvari domates bitkisinde 258 bp'lik bir bant oluşturmuştur. Baz farkı 51 bp olarak belirlenmiş, polimorfik olduğu teyit edilmiştir.

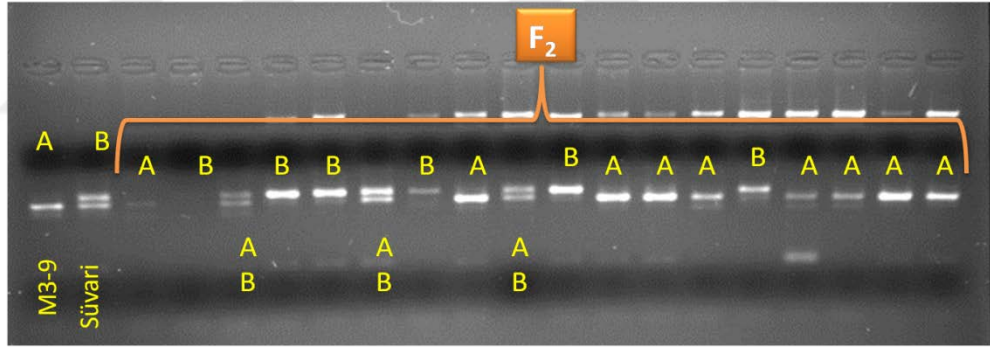
SL20210\_883i moleküler markörü hastalığa direnç gösteren M3-9 domates bitkisinde 166 bp'lik bant oluşturmuşken, Süvari domates bitkisinde 185 bp'lik bir bant oluşturmuştur. Baz farkı 19 bp olarak tespit edilmiş, polimorfik olduğu teyit edilmiştir.

TGS986 moleküler markörü hastalığa direnç gösteren M3-9 domates bitkisinde 288 bp'lik bant oluşturmuşken, Süvari domates bitkisinde 300 bp'lik bir bant oluşturmuştur. Baz farkı 12 bp olarak belirlenmiş, polimorfik olduğu teyit edilmiştir.

SSR96 moleküler marköründe baz farkı 6, TOM202 primerinde baz farkı 9, SSR27 primerinde baz farkı 4 bp olarak bulunmuştur. SSR45, SSR350, SSR241 ve

SSR65 primerlerinde ise M3-9 domates bitkisi ve Süvari çeşitleri sırası ile 258, 300, 185 ve 240 bp' lik bantlar oluşturmuşlar fakat bantların büyüklükleri aynı olduğu için polimorfizm gözlemlenememiştir.

*Cmm2* hastalık etmenine karşı direnç gösteren M3-9 ve direnç göstermeyen ticari hibrit çeşit Süvari domates bitkileri arasındaki yapılan PCR amplifikasyonu sonucunda polimorfik olarak bulunan primerler ♀M3-9 X Süvari♂ F<sub>2</sub> popülasyonunda yetiştirilen 80 bitkiden en dirençli ve en dirençsiz 9'ar bitkide test edilmiştir. Yapılan PCR sonuçlarıyla fenotipteki bitkilerin hastalığa karşı gösterdikleri tepkiler genotipte moleküler markörler yardımıyla eşleştirilmiştir. Anne ve baba bitkilerde polimorfizmi belirlenen SL20210\_883İ moleküler markörü ile ♀M3-9 X Süvari♂ F<sub>2</sub> popülasyonu bitkilerinde yapılan haritalama çalışmalarında bitkilerin hastalığa karşı fenotipteki direnç durumu ve hassaslık durumları genotipte de skorlanmıştır (Şekil 4.7., Çizelge 4.5. ).



**Şekil 4.7.** F<sub>2</sub> popülasyonu bitkilerde SL20210\_883i primeri ile yapılan haritalamanın %3'lük Metaphore jeldeki görüntüsü

**Çizelge 4.5.** F<sub>2</sub> popülasyonu bitkilerde SL20210\_883i primeri ile yapılan haritalama sonuçlarının skorlanması (A: M3-9, B: süvari, D:Dayanıklı H:Hassas HZ: Heterozigot F.Ö.: ♀M3-9 X Süvari♂ F<sub>2</sub> popülasyonu).

Sıra	Bitki	D/H	Skor	Sıra	Bitki	D/H	Skor
1	M3-9	D	A	11	F.Ö.40	H	HZ
2	Süvari	H	HZ	12	F.Ö.43	H	B
3	F.Ö.1	D	A	13	F.Ö.44	D	A
4	F.Ö.3	H	B	14	F.Ö.46	D	A
5	F.Ö.4	H	HZ	15	F.Ö.47	D	A
6	F.Ö.11	H	B	16	F.Ö.48	H	B
7	F.Ö.13	H	B	17	F.Ö.51	D	A
8	F.Ö.17	H	HZ	18	F.Ö.58	D	A
9	F.Ö.29	H	B	19	F.Ö.60	D	A
10	F.Ö.34	D	A	20	F.Ö.64	D	A

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünya’da ve Türkiye’de domates üretim alanlarında *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*’nin neden olduğu bakteriyel kanser hastalığı büyük ekonomik zararlara neden olmaktadır. Araştırmacılar yaptıkları epidemi çalışmalarında bu hastalıktan dolayı meydana gelen ürün kayıplarındaki miktarları çeşitli bölgelerde tespit etmişlerdir. Hastalık etmenine karşı gerek tarla koşullarında gerekse laboratuvar koşullarında mücadele için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Fakat günümüzde net olarak hastalığa karşı bir mücadele yöntemi geliştirilememiştir. Hastalık etmeninin bitkiye bulaşmasında çeşitli inokulum kaynakları olduğu bilinmektedir. Özellikle tohumdan oluşan enfeksiyonlarda tarla ve seralarda %100 zarar meydana getirebilmektedir. Çiftçiler kimyasal kullanarak hastalık seyrini biraz azaltabilseler de ilerleyen dönemlerde hastalığa karşı yapılabilecek bir şey kalmamaktadır. Son yıllarda araştırmacılar etkin ve devamlı bir mücadele yöntemi olan dayanıklı çeşit üzerinde çalışmaya başlamışlardır. Ülkemizde yapılan çalışmalar sonucunda domates bakteriyel kanser hastalığına karşı tam olarak dayanıklı bir ticari çeşit olmadığı teyit edilmiştir.

Çalış ve ark., (2012) yaptıkları bir çalışma sonucunda *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*’in domates bitkisinde en fazla enfeksiyona ve zarara neden olan ırkı *Cmm2* izolatına direnç göstermeyen NCEBR3 ticari saf domates hattını tek bazlık değişimlere neden olan EMS mutageniyle mutasyona uğratmışlardır. Elde edilen mutant tohumlarıyla M1, M2 ve M3 popülasyonlarına kadar kendileme yaparak gelmişlerdir. Çalışmaların sonucunda ise M3 popülasyonunda M3-9 bitkisinin *Cmm2* izolatına direnç gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Yüksek lisans tezi olarak yapılan bu çalışma NCEBR3 domates bitkisinin muatsyonu sonucu elde edilen M3- 9 bitkisinde dayanıklılığı sağlayan lokusun hangi kromozom üzerinde olduğunu teyit etmektir. Bu amaçla M3-9 bitkisi ile ticari hibrit çeşit olan Süvari F<sub>1</sub> domates bitkisinin birbirleriyle melezlenmesi sonucunda ♀M3-9 X Süvari♂ F<sub>1</sub> popülasyonu elde edilmiştir. Elde edilen ♀M3-9 X Süvari♂ F<sub>1</sub> popülasyonu bitkiler hastalık etmeni *Cmm2* ile patojenisite testine tabi tutulmuştur. Patojenisite testleri sonucunda melez F<sub>1</sub> popülasyonunda bulunan bitkilerin tamamında hastalığa karşı dirençsizlik (hassaslık) olduğu teyit edilmiştir. Haritalama çalışmalarının

yapılabilmesi için ♀M3-9 X Süvari♂ F<sub>1</sub> bitkileri yetiştirilmiş ve kontrollü bir şekilde kendilenmesine izin verilmiştir. Kendileme sonucu oluşan meyvelerden elde edilen tohumlar haritalama çalışmalarının yapıldığı ♀M3-9 X Süvari♂ F<sub>2</sub> popülasyonunu oluşturmuştur. Bu popülasyondan haritalama çalışmalarının yapılabilmesi için 80 bitki yetiştirilmiştir. ♀M3-9 X Süvari♂ F<sub>2</sub> popülasyonunda yetiştirilen 80 bitki üzerinde *Cmm2* patojeniyle patojenisite testleri yapılmıştır. Yapılan patojenisite testleri sonucunda popülasyonda hastalığa karşı en fazla direnç gösteren ve en az direnç gösteren 9'ar tane bitki seçilmiş ve önceden anne baba arasındaki polimorfizmin belirlendiği primerler ile haritalama çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Van Heusden ve ark., (1999)'nın belirttiklerine göre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'e dirençli LA2157 (*Solanum peruvianum* orjinli) yabancı domates hattı ve LA407 (*Solanum hirsutum* orjinli) yabancı domates hatları geliştirilmiş, bu geliştirilen domates hatlarında hastalığa direnç konusunda çalışmalar yapılmıştır. LA407 yabancı domates hatlarında yapılan çalışmalarda hastalığa karşı dirençli olarak buluntur. Yapılan başka bir çalışmada LA2157 (*Solanum peruvianum* orijinli ) yabancı domates hattı hastalığa karşı en dirençli bitki olarak tespit edilmiştir (Francis ve ark., 2001). Ayrıca LA2157 ile yapılan genetik analizlerde dayanıklılık genleriyle ilgili ilk çalışmalarda 5 kantitatif (Quantitative trait loci :QTL) gen lokusu (Sandbrink ve ark.,195) ve sonraki çalışmalarda 3 QTL (Van Heusden ve ark., 1999) belirlenerek, en etkili QTL'nin 7. kromozomda olduğu belirtilmiştir. 7 no'lu kromozomda *S. peruvianum* kaynaklı dayanıklılıkla ilişkili SCAR moleküler markörü ile belirlenerek, ıslahat kullanılabileceği belirtilmiştir. LA407 materyali ile yapılan genetik çalışmalarda *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* izolatlarına dayanıklılıkla ilgili 2. ve 5. kromozomlarda bulunan 2 QTL belirlenerek, her iki QTL ile ilişkili dayanıklılık geni analogları (resistance gene analogs: RGA) markörleri belirlenmiştir.

Yapılan bu çalışmada 104 tane SSR ve 19 tane INDEL markörü kullanılarak anne, baba ebeveynlerle birlikte 10 adet dayanıklı F<sub>2</sub> popülasyonu ve 10 adet hassas F<sub>2</sub> popülasyonu domates bitkisinde ortalama her kromozomda 10 adet markör kullanılarak haritalama çalışması yapılmıştır. Yapılan haritalama çalışması sonucunda bitkilerde gerçekleştirilen patojenisite testi sonucu hassaslık ve dayanıklılık durumları yani fenotipteki hassaslık ya da dayanıklılık genotipte bir INDEL markörü ile eşleşerek

dayanıklılığın haritalanması sağlanmıştır. Haritalama çalışması sonucu M3-9 mutant bitkisinde dayanıklılığın 5. kromozomda bir lokus tarafından kontrol edildiği belirlenmiştir. Aynı zamanda yapılan haritalama çalışması ve kalıtım derecesi hesaplama çalışmalarında dayanıklılık geninin çekinik karakterde olduğu ve çekinik karakterdeki dayanıklılığın bir sonraki popülasyona aktarılabildiği de tasdik edilmiştir.

Araştırmacılar daha önce yaptıkları çalışmalarda saf hat özelliği gösteren yabancı hatlarda çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışma da ise tam tersine ticari bir çeşitte dayanıklılık oluşturulup daha sonra bu çeşide genetik olarak zenginlik kazandırılmıştır. Genetik zenginliğin kazandırılmasıyla F<sub>2</sub> popülasyonunda 120'den fazla markör ile tarama yapılarak dayanıklılık lokusu araştırması yapılmıştır. 5. Kromozom üzerinde bulunan bu markör yardımı ile ileride yapılacak olan sequenç çalışmaları, gen klonlama, aminoasit dizilimi ve genin protein yapıları gibi araştırılacak çalışmalara kolaylık sağlayacaktır.

## 6. KAYNAKLAR

- Agrios, G.N., 1997. Plant Pathology. Fouth edition Academic pres, London.
- Anonim, 2016a. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Domates> (16.05.2016)
- Anonim, 2016b. <http://www.akfa.com.tr/likopen.html> (05.05.2016)
- Anonim, 2016c. [https://tr.wikipedia.org/wiki/Polimeraz\\_zincir\\_tepkimesi](https://tr.wikipedia.org/wiki/Polimeraz_zincir_tepkimesi) (25.05.2016)
- Ballvora, A., J. Hesselbach, J. Niewöhner, D. Leister, F. Salamini, and C. Gebhardt. 1995. Marker enrichment and high-resolution map of the segment of potato chromosome VII harbouring the nematode resistance gene Gro1. Mol Gen. Genet. 249: 82-90.
- Basım, E., 2002. Isparta Ve Çevresindeki Sera Domateslerinde Görülen Bakteriyel Patojenlerin Belirlenmesi. S.D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi No:6,1-8s.
- Belgüzar, S., 2014. Tokat Yöresinde Domates Bakteriyel Solgunluk Hastalığı Etmeni (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)’nin Tanılanması ve Epidemiyolojisi Üzerine Araştırmalar(Doktora Tezi). Fen Bilimleri Enstitüsü, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı, Tokat.
- Bradshaw, J.E., C.A. Hackett, R.C. Meyer, D. Milbourne, J.W.McNicol, M.S. Philips and R.Waugh. 1998. Identification of AFLP and SSR markers associated with quantitative resistance to *Globodera pallida* (Stone) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) with a view to marker-assisted selection. Theor. Appl. Genet. 97: 202-210.
- Cano, A., Acosta, M., Arnao, M. B., 2003. Hydrophilic and lipophilic antioxidant activity changes during on-vine ripening of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Postharvest Biology and Technology 28: 59–65.
- Chan, J.M., Gann, P.H., Giovannucci., E.L., 2005. “ Role of diet in prostate cancer development and progression”, J. Clin. Oncol., 23; 8152-8160.
- Ciccarone, A. ve Carili, A., 1948. Osservasion di Camposu *Cornebacterium michiganense* ( Smith) Jensen e considerazioni su unpossibble caso di sua sopravvivenza nel terreno. Bolletino della Stazione di Patologia Vegetale No: 6, 177 -179p.
- Çalış, Ö., Bayan, Y. ve Çelik, D., 2012. Characterization of resistant tomato mutants to bacterial canker disease. African Journal of Biotechnology, Vol 11, No:32.

- Çalış, Ö., Karabulut, D., Karakaş, H., ve Özdemir, F., 2015. Bakteriyel Kanser ve Solgunluk Hastalığına Dayanıklı Domates Genotiplerinde Dayanıklılığın Karakterizasyonu, İç Anadolu 2. Tarım ve Gıda Kongresi, Nevşehir, 358.
- Çalış, Ö., Karakaş, H., Özdemir, F., Karabulut 2014a. Bakteriyel Kanser ve Solgunluk Hastalığına Dayanıklı Domates Genotiplerinde Haritalama Çalışmaları, 10. Sebze Tarımı Sempozyumu, 2-4 Eylül Tekirdağ, 89-94.
- Çalış, Ö., Özdemir, F., Karakaş, H., Karabulut, D., Çelik-Ertekin, D, Saygı, S., Topkaya, Ş., 2014b. Domates Genetik Kaynakları Merkezi Tohumlarının Moleküler Dayanıklılık ve Biyoteknoloji Çalışmalarında Kullanılması, Uluslararası Katılımlı Türkiye 5. Tohumculuk Kongresi ve Sektörel İş Formu Ekim Diyarbakır.
- Çalış, Ö., Saygı, S., Çelik, D, Karabulut, D., Kara, M., Karakaş, H., 2013b. Bakteriyel Kanser Hastalığına Genetik Olarak Farklı Mutasyonlara Sahip Dayanıklı Domatesler, Türkiye V. Organik Tarım Sempozyumu, 25-27 Eylül Samsun.
- Çalış, Ö., Saygı, S., Çelik, D.ve Bayan, Y., 2013a.Domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığına dayanıklılık ve ters genetik. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 26(1):11-17.
- Çalış, Ö., ve Çelik, D., 2011. Bitki Dayanıklılık Genleri ve Proteinleri. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 4 (2):1-9
- Çetinkaya-Yıldız, R. ve Aysan, Y., 2008. Domates Bakteriyel Solgunluk Hastalığı, Tomato Bacterial Wilt Disease, Stem Canker, Bird's Eye Spot, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. (H. SAYGILI, F. SAHİN, 54 Y. AYSAN editörler). Bitki Bakteri Hastalıkları, Meta Basım Matbaacılık, Bornova-İzmir, s.49-52.
- Ekinci, S., 1972. Özel Sebzeçilik. Ahmet Sait Matbaası, İstanbul.
- Erkan, S., 1988. Tohum Patolojisi..i. Gözdem Ofis. s 275.
- Eserkaya-Güleç, T., Yıldırım, A., ve Ateş-Sönmezoğlu, Ö., 2010. Bitkilerde Markör Destekli Seleksiyon. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 3(2): 67-79, 2010.
- FAO, 2015. <http://www.fao.org> 12.05.2015
- Fatmi, M. ve Schaad, N.W., 2002. Survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. Plant Pathology, 149-154.

- Francis, D.M., Kabelka, E., Bell, J., Franchino, B. ve Clair, D., 2001. Resistance to bacterial canker in tomato (*Lycopersicon hirsutum* LA407) and its progeny derived from crosses to *L. esculentum*. *Plant Dis.*, 85:1171-1176p.
- Giovannucci, E., 2005. “Tomato products, lycopene, and prostat cancer: a review of epidemiologic literature”. *J. Nutr.*, 135; 2030S-2031S.
- Gleason, M.L., Gitaitis, R.D. ve Ricker, M., 1993. Recent progress in understanding and controlling bacterial cancer of tomato in Eastern North America *Plant Disease*, 75: 834-838.
- Gleason, M.L., Gitaitis, R.D. ve Ricker, M., 1993. Recent progress in understanding and controlling bacterial cancer of tomato in Eastern North America *Plant Disease*, 75: 834-838.
- Grierson, D. ve Kader, A. A., 1986. Fruit Ripening And Quality. In *The Tomato Crop*, 241-280p, Newyork.
- Günay, A., 2005. Sebze Yetiştiriciliği Cilt II. Meta Basımevi, 530s. İzmir.
- Holt, J. G., N. R., Krieg, P. H. A., Sneath, J. T., Staley ve Williams, S. T., 1994. *Clavibacter*. Bergey’s manual of determinative bacteriology 9th edition. Williams & Wilkins, Baltimore, 787p.
- Joshi, S.P., V.S. Gupta, R.K. Aggarwal, P.K. Ranjekar, D.S. Brar, 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theor. Appl. Genet.*, 100, 1311–1320.
- Kabaş, A., Ünlü, A., İlbi, H., Oğuz, A., Zengin, S., 2010. BATEM Domates Hatlarının Bakteriyel Kanser ve Solgunluk (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)’a Dayanıklılık Durumlarının Belirlenmesi. VIII. Sebze Tarımı Sempozyumu 23-26 Haziran, Van. Shahidi, F. ve Naczk, M., 1995. *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications*. Technomic Pub., PA, USA.
- Kalt, W., Forney, C. F., Martin, A., Prior, R. L., 1999. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47: 4638–4644.
- Karabulut, D., 2014. Bakteriyel Kanser ve Solgunluk (*Clavibactermichiganensis* subsp. *michiganensis*: Cmm) Hastalığına DAYANIKLI Ümitvar Domates

- Mutantlarında Dayanıklılığın Moleküler Karakterizasyonu. (Yüksek Lisans Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı, Tokat.
- Karaca, İ., ve Saygılı, H., 1982. Batı Anadolu'nun bazı illerinde domates ve biberde görülen bakteriyel hastalıkların oranı, etmenleri ve konukçu çeşitlerinin duyarlılığı üzerine araştırmalar. III. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 12-15 Ekim, Adana, 182-192.
- Kasap, H., 2010. Sebzeçilik. T.C. Samsun Valiliği İl Tarım Müdürlüğü, 26-27s, Samsun.
- Kesawat, M.S. ve B.K Das, 2009. Molecular Markers: It's Application in Crop Improvement. J. Crop Sci. Biotech., 12 (4),169 -181.
- Kopsell, D. A., ve Kopsell, D. E., 2006. "Accumulation and bioavailability of dietary carotenoids in vegetable crops". Trends Plant Sci., 11; 499-507.
- Küçüker, O., 1994. Tıbbi Biyologlar için Botanik Ders Kitabı. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları İstanbul. 183-184.
- Lindhout, P. ve Purimaha, C., 1989. Resistance Against *Corynebacterium michiganense* Found In *Lycopersicon peruvianum*. Pages 162-165 In Modern Trends In Tomato Genetics And Breeding; Synopses 10th Meeting Eucarpia Tomato Working Group.
- Louws, F. J., Bell, J., Medina-Mora, C. M., Smart, C. D., Opgenorth, D., Ishimaru, C. Martin, G.B., Brommonschenkel, S.H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganal, M.W., Spivey, R.W.T., Earle, E.D. ve Tanksley, S.D., 1993. Mapbased cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. Science, 262: 1432-1436.
- Lu, Z.-X., K. Sossey-Alaoui, G.L. Reighard, Wm.V. Baird, and A.G. Abbott. 1999. Development and characterization of a codominant marker linked to root-knot nematode resistance, and its application to peach rootstock breeding. Theor. Appl. Genet. 99:115-122.
- Martin, GB., Brommonschenkel, SH., Chunwongse, J., Frary, A., Ganal, MW., 1993. Map based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. Science 262:1432-1436.

- Matsuoka, Y., S.E. Mitchell, S. Kresovich, M. Goodman, J. Doebley, 2002. Microsatellites in *Zea*-variability, patterns of mutations and use for evolutionary studies. *Theor. Appl. Genet.*, 104, 436-450.
- Nejat, N., Sijam, K., Abdullah, S.N.A., Vadamalai, G. ve Dickinson, M, 2009. Molecular characterization of a phytoplasma associated with Coconut Yellow Decline (CYD) in Malaysia. *American Journal of Applied Sciences*, 6 (7), 1331-1340.
- O’Kennedy, N., Crosbie, L., Whelan, S., Luther, V., Horgan, G., Brom, J.I., Webb, D.J., Duttaroy, A.K., 2006. Effects of tomato extract on platelet function: a doubleblinded crossover study in healthy humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 561-569p, USA.
- Omoni, A.O., Aluka, R.E., 2005. “ The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene a review”. *Trends Food Sci. Technology.*, 16; 344-350.
- Öktem, Y., E ., 1984, Domates bakteriyel solgunluğu (*Corynebacterium michiganense*)’nun Ankara İlindeki yayılışı, etmenin toprak ve bitkiden izolasyonu ile bitki artıklarında yaşama süresi üzerine çalışmalar. Türkiye’ de Sertifikalı ve Kontrollü Tohumluk Üretim ve Dağıtım Sorunları Simpozyumu, 8 -10 Şubat, s27, Ege Üniv. Atatürk Kültür Merkezi, İzmir.
- Özaktan, H, 1991. Domates Bakteriyel Solgunluğu (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) ile Savasım Olanakları Üzerine Arastırmalar. Ege Üniversitesi Doktora Tezi, Bornova-İzmir, 98s.
- Özaktan, H., ve Bora, T., 1991. Domates Bakteriyel Solgunluğu (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al ) ile savasım olanakları üzerinde Arastırmalar. Doktora Tezi, sf: 99.
- Özyılmaz, Ü., 2001. Aydın İlinde Sera Domateslerinde Toprak Kaynaklı Bakteriyel Hastalıkların Saptanması (Yüksek Lisans tezi), Adnan menderes üniv. Zir. Fak.,Aydın.
- Patino-Mendez, G., 1964. Studies on the pathogenicity of *Corynebacterium michiganense* (E. F. Smith) Jensen and its transmission into tomato seed. PhD Thesis. Davis, CA, USA: University of California.
- Roberts, P.A. 2002. Consept and consequences of resistance in plant resistance to parasitic nematodes (e.ds J.L. Starr, R. Cook and J. Bridge). CAB International Pub.UK.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. ve Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning A Laboratory Manual. 2. Edition, ISBN: 0-87969-309-6, 9.14 Page, United States of America
- Sandbrink, JM, Ooijen JWv, Purimahua CC., Vrieling M., Verkerk P., Zabel P., Lindhout P., 1995. Localization of genes for bacterial canker resistance in *Lycopersicon peruvianum* using RFLPs. *Theor Appl Genet* 90: 444–450.
- Shahidi, F. ve Naczk, M., 1995. Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications. Technomic Pub., PA, USA.
- Sherf, A. F., ve Macnab, A. A., 1986. Vegetable diseases and their control. A WileyInterscience Publication, New York, 711 p.
- Staub, J.E., F.C. Serquen and M. Gubta. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience*. 31: 729-740.
- Strider, D.L., 1967, Survival studies with the tomato bacterial cancer organism. *Phytopathology*, 57: 1067 -1071.
- Sunyaev, S., J. Hanke, A. Aydin, U. Wirkner, I. Zastrow, J. Reich, P. Bork, 1999. Prediction of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in human disease-associated genes. *J Mol Med*, 77, 754–760.
- Tokgönül, S., 1998. Ticari Domates Tohumlarında Bakteriyel Solgunluk Etmeni (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)’nin Saptanması Ve Etmene Karşı Mücadele Olanakları Üzerine Araştırmalar.(Doktora Tezi), Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Adana.
- Üstün, N., 2008. Patates Kahverengi Çürüklük Hastalığı Brown Rot of Potato Domates ve Sardunya Bakteriyel Solgunluk Hastalığı Southern Bacterial Wilt of Tomato and Geranium Muz Moko Hastalığı Moko Disease of Banana Tütün Granville Solgunluğu Granville Wilt of Tobacco *Ralstonia solanacearum*. (H. Saygılı, F. Şahin, Y. Aysan editörler). Bitki Bakteri Hastalıkları, Meta Basım Matbaacılık, Bornova-İzmir, s. 127-134.
- Van Heusden, A.W., Koornneef, M., Voorrips, R.E., Brüggemann, W. G., Pet, Vrieling van Ginkel, X.Chen R., Lindhout P. 1999. Three Qtls From *Lycopersicon Peruvianum* Confer A High Level Of Resistance to *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*.

- Vural, H., Eşiyok, D., Duman, İ., 2000. Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme). Ege Üniversitesi., Ziraat Fak., Bornova, İzmir.
- Willcox, J.K., Catignani, G.L. ve Lazarus, S., 2003. “ Tomatoes and cardiovascular health. Crit. Rev.”, Food Sci. Nutr., 43; 1-18.
- Yazgan, A., Fidan, S., 1996. Tokat Koşullarına Uygun Kiraz Domates (*Lycopersicon esculentum* Mill. var. *Cerasiforme*) Çeşitlerinin Belirlenmesi. GAP 1. Sebze Tarımı Sempozyumu, 19-23s. Şanlıurfa.
- Young, N.D. 1996. QTL Mapping and quantitative disease resistance in plants. Annu. Rev. Phytopathol. 43:479-501
- Yıldız, R. Ç., 2007. Domates Bakteriyel Solgunluk Hastalığı Etmeni (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et. al.)'nin Tanılanması Ve Bitki Büyüme Düzenleyici Rizobakteriler İle Biyolojik Mücadele Olanaklarının Araştırılması.(Doktora Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Anabilim Dalı, Adana.

## 7. EKLER

### EK-A

#### **Glikoz yeast carbonate agar (GYCA) besi yeri**

Glucose	5 gram (g)
Yeast extract	5 g
Calcium carbonate	40 g
Agar agarı	15 g

Yukarıda verilen kimyasallar tartılarak erlenmayere dökülmüştür. Kimyasallar üzerine 1 litere dH<sub>2</sub>O (steril saf su) eklenmiştir. Karışımın pH'sı 7.2'ye getirilerek sabitlenmiştir. Karışım içersine 15 g agar agarı eklenerek iyice eritilmiştir. Erlenmayerin üzeri pamuk ile kapatılmış pamuğun üstüne folyo çekilmiştir. Sterilizasyon için 1 atm basınçta 121 °C'de 15-20 dk. Otoklav edilmiştir. Otoklavdan çıkan besi yerleri 40 °C sıcaklığa düşünce steril kabin içinde, steril 90 mm çaplı plastik petrilere yaklaşık olarak 15-20 mililitre (ml) dökülecek şekilde ayarlanmış ve katılaşmaları sağlanmıştır.

#### **KİNG B Besi yeri**

Protease Peptone	20 g
Gliserin	10 ml,
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1.5 g
Agar agarı	15 g.

King-B besi yeri de GYCA besi ortamı gibi hazırlanmış ve petrilerde katılaşması sağlanmıştır.

## **EK-B**

### **%70'lik Etil alkol çözeltisi**

Etil alkol 0.7 litre

Steril saf su 0.3 litre

Sırasıyla etil alkol üzerine steril saf su eklenerek %70'lik etil alkol çözeltisi elde edilir.

### **Nutrient Broth (NB) Sıvı Besi Yeri**

Nutrient Broth 8 g

Distile saf su 1000 ml

121°C'de 1 atm basınçta 15 dakika otoklav edilmiştir.

### **100 ml Ekstraksiyon (Ctab) Buffer için;**

65 ml dH<sub>2</sub>O

10 ml 1M Tris pH:7,5

14 ml 5M NaCl

10 ml 0,5M EDTA pH:8,0

1 g CTAB kimyasal karışımı hazırlanarak

1 ml 14 Molar Beta-MerkaptoEthanol (BME) eklenir.

### **10X TE BUFFER**

Tris-HCl pH:8,0 12,1 g L<sup>-1</sup>

Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O pH:8,0 3,7 g L<sup>-1</sup>

### **%0,85'lik NaCl çözeltisi**

8,5 g NaCl

1 litre steril saf su

EK-C

Çizelge 7.1. Çalışmada kullanılan SSR markörleri listesi

Kromozom	Marker İsmi	Nükleotid sıralaması	Annealing sıcaklığı	Pozisyon
1	SSR92	<b>Forward primer (5'-3')</b> AAGAAGAAGGATCGATCGAAGA <b>Reverse primer (5'-3')</b> TCATGACCACGATACTACATGTTTC	50° C	0,00 cM
1	TOM196	<b>Forward primer (5'-3')</b> CCTCCAAATCCCAAACTCT <b>Reverse primer (5'-3')</b> TGTTTCATCCACTATCACGA	45°C	?
1	SSR192	<b>Forward primer (5'-3')</b> ACAACATGGGAAGCACTTGA <b>Reverse primer (5'-3')</b> ATTAAATTGGGCCATGGTGA	50° C	31,50 cM
1	SSR308	<b>Forward primer (5'-3')</b> TTCCCTGTTTCAGCCTTTG <b>Reverse primer (5'-3')</b> GGCACGAGAATTTAGCCACT	55° C	121,00 cM
1	SSR222	<b>Forward primer (5'-3')</b> TTCATCTGGTGCTGCTGTT <b>Reverse primer (5'-3')</b> TTCTTGAGGACCCAGAAAC	55°C	97,50 cM
1	TOM202	<b>Forward primer (5'-3')</b> TGGTCACCTTCAACTTTTATAC <b>Reverse primer (5'-3')</b> AAATGATAATGAAATGGAGTGA	50°C	?
1	TES233	<b>Forward primer (5'-3')</b> GCCTTTCCGATCACTCCAAA <b>Reverse primer (5'-3')</b> AAGATGCCCGTACATTCGAC	55°C	2.12 MB 24.10 cM
1	TGS2028	<b>Forward primer (5'-3')</b> GTCTAGAGGATCTCGTCGATCA <b>Reverse primer (5'-3')</b> CTAGCTGCTCGGGATGTAGG	55°C	23.39 MB 29.48 cM
1	SSR65	<b>Forward primer (5'-3')</b> GGCAGGAGATTGGTTGCTTA <b>Reverse primer (5'-3')</b> TTCTCCTGTTTCATGCATTC	50°C	159,00 cM
1	SSR117	<b>Forward primer (5'-3')</b> AATTCACCTTTCTTCCGTCG <b>Reverse primer (5'-3')</b> GCCCTCGAATCTGGTAGCTT	50°C	138,00 cM
2	SSR5	<b>Forward primer (5'-3')</b> TGGCCGGCTTCTAGAAATAA <b>Reverse primer (5'-3')</b> TGAAATCACCCGTGACCTTT	55°C	1.90 cM

**Çizelge 7.1. (Devam)** Çalışmada kullanılan SSR markörleri listesi

<b>Kromozom</b>	<b>Marker İsmi</b>	<b>Nükleotid sıralaması</b>	<b>Annealing sıcaklığı</b>	<b>Pozisyon</b>
2	SSR26	<b>Forward primer (5'-3')</b> CGCCTATCGATACCACCACT <b>Reverse primer (5'-3')</b> ATTGATCCGTTTGGTTCTGC	55°C	67,70 cM
2	SSR96	<b>Forward primer (5'-3')</b> GGGTTATCAATGATGCAATGG <b>Reverse primer (5'-3')</b> CCTTTATGTCAGCCGGTGTT	50°C	36,50 cM
2	SSR22	<b>Forward primer (5'-3')</b> GATCGGCAGTAGGTGCTCTC <b>Reverse primer (5'-3')</b> CAAGAAACACCCATATCCGC	60°C	99,00 cM
2	SSR51	<b>Forward primer (5'-3')</b> CTACCCTGGTCTTGGTGGAA <b>Reverse primer (5'-3')</b> AAAGGATGCTCTAGCTTCTCCA	50°C	39,50 cM
2	SSR32	<b>Forward primer (5'-3')</b> TGAAAGAAGCAGTAGCATTG <b>Reverse primer (5'-3')</b> CAACGAACATCCTCCGTTCT	50°C	78,00 cM
2	SSR356	<b>Forward primer (5'-3')</b> ACCATCGAGGCTGCATAAAG <b>Reverse primer (5'-3')</b> AACCATCCACTGCCTCAATC	55°C	44,00 cM
2	SSR605	<b>Forward primer (5'-3')</b> TGCCCGCTTCTAGAAATAA <b>Reverse primer (5'-3')</b> TGAAATCACCCGTGACCTTT	55°C	48,50 cM
2	SSR349	<b>Forward primer (5'-3')</b> GAGTGATCATCCATCCTCTCA <b>Reverse primer (5'-3')</b> GGAAGAGACTTTGGACTAAGG GA	55°C	47,50 cM
3	TGS373	<b>Forward primer (5'-3')</b> GCATAGCGTTTTGTGGGGATT <b>Reverse primer (5'-3')</b> TAGTACAGGTGGAAACGGGC	55°C	50,24 cM
3	TGS2121	<b>Forward primer (5'-3')</b> GTTGAATATGCGAAACCGTCT <b>Reverse primer (5'-3')</b> CAATGTGAGACTTCTTGCCG	55°C	59,57 cM
3	SSR231	<b>Forward primer (5'-3')</b> TGCCAATCCACTCAGACAAA <b>Reverse primer (5'-3')</b> TGGATTCACCAAGGCTTCTT	50°C	75,40 cM

**Çizelge 7.1. (Devam)** Çalışmada kullanılan SSR markörleri listesi

<b>Kromozom</b>	<b>Marker İsmi</b>	<b>Nükleotid sıralaması</b>	<b>Annealing sıcaklığı</b>	<b>Pozisyon</b>
3	SSR27	<b>Forward primer (5'-3')</b> CCCAAATCAAGGTTTGTGGT <b>Reverse primer (5'-3')</b> TCAGATGCCACCACTCTCAG	50°C	169,00 cM
3	SSR22	<b>Forward primer (5'-3')</b> GATCGGCAGTAGGTGCTCTC <b>Reverse primer (5'-3')</b> CAAGAAACACCCATATCCGC	60°C	99,00 cM
3	SSR86	<b>Forward primer (5'-3')</b> AGGGCAACAAATCCCTCTTT <b>Reverse primer (5'-3')</b> GGAGACGAGGCTGCTTACAC	50°C	54,00 cM
3	SSR50753	<b>Forward primer (5'-3')</b> TGCAACATCTTAGCTCCAAGCTAGG <b>Reverse primer (5'-3')</b> CATGGACCAAGAATATGGAAACTGC	55°C	72,60 cM
4	SSR296	<b>Forward primer (5'-3')</b> CCGGAACAAGTCCCTTCATA <b>Reverse primer (5'-3')</b> TCAGCCAAGTTCATGGTACATC	55°C	9.90 cM
4	SSR593	<b>Forward primer (5'-3')</b> TGGCATGAACAACAACCAAT <b>Reverse primer (5'-3')</b> AGGAAGTTGCATTAGGCCAT	55°C	13.90 cM
4	TGS2243	<b>Forward primer (5'-3')</b> GTCAGGAGCGGCTCAATATAA <b>Reverse primer (5'-3')</b> TCTTTGAAGTTTATCAACATATTACGA	55°C	37.63 cM
4	SSR603	<b>Forward primer (5'-3')</b> GAAGGGACAATTCACAGAGTTTG <b>Reverse primer (5'-3')</b> CCTTCAACTTCACCACCACC	50°C	45.29 cM
4	SSR638	<b>Forward primer (5'-3')</b> GTTGGTTGGAGAAACTCCC <b>Reverse primer (5'-3')</b> AGGCATTTAAACCAATAGGTAGC	45°C	25,30 cM
4	TOM184	<b>Forward primer (5'-3')</b> CAACCCCTCTCCTATTCT <b>Reverse primer (5'-3')</b> CTGCTTTGTGAGTTTGAA	45°C	25,30 cM
4	SSR214	<b>Forward primer (5'-3')</b> AAATTCCCAACACTTGCCAC <b>Reverse primer (5'-3')</b> CCCACCACTATCCAAACCC	50°C	95,00 cM

**Çizelge 7.1. (Devam)** Çalışmada kullanılan SSR markörleri listesi

Kromozom	Marker İsmi	Nükleotid sıralaması	Annealing sıcaklığı	Pozisyon
5	SSR590	<b>Forward primer (5'-3')</b> TCTCAAAGTCGTTCCCTTCTTGA <b>Reverse primer (5'-3')</b> GGAAGAGAAACGCGGACATA	55°C	107.50 cM
5	TES1594	<b>Forward primer (5'-3')</b> GTGGAGAGAATCACAAGGATGG <b>Reverse primer (5'-3')</b> TCATCGCATTTCATAAACAGAGT	55°C	112.75 cM
5	TGS986	<b>Forward primer (5'-3')</b> TTCCCATCTCGGAAATCTCA <b>Reverse primer (5'-3')</b> GGTAACCTTTATGCAATTTGAGG	55°C	116.22 cM
5	TGS1606	<b>Forward primer (5'-3')</b> GATCAGATGCAATCCACCGTT <b>Reverse primer (5'-3')</b> TCGAATTTCCGCCCATAT	55°C	119.37 cM
5	TES1307	<b>Forward primer (5'-3')</b> GCCGTTAATGAATGGTCGTT <b>Reverse primer (5'-3')</b> CCCTTCAAATCCACTCAA	55°C	119.82 cM
5	TOM210	<b>Forward primer (5'-3')</b> CGTTGGATTACTGAGAGGTTTA <b>Reverse primer (5'-3')</b> ACAAAATTCACCCACATCG	45°C	25,30 cM
5	SSR49	<b>Forward primer (5'-3')</b> TCTCAAAGTCGTTCCCTTCTTGA <b>Reverse primer (5'-3')</b> GGAAGAGAAACGCGGACATA	50°C	106,00 cM
5	SSRB18031	<b>Forward primer (5'-3')</b> AGACTCAGTCCCGAACAAGTTGA AG <b>Reverse primer (5'-3')</b> ACATTACTAAACCCCAATTGC C	55°C	119,00cM
5	SSR13	<b>Forward primer (5'-3')</b> GGGTCACATACACTCATACTAAG GA <b>Reverse primer (5'-3')</b> CAAATCGCGACATGTGTAAGA	50°C	27,00cM
6	TES1406	<b>Forward primer (5'-3')</b> GAATTC AAGATCCGGCAGATG <b>Reverse primer (5'-3')</b> AATAGATGAGGGGGCAAGGT	55°C	99.77 cM
6	TGS588	<b>Forward primer (5'-3')</b> GCAACAATGCAAGCGAAGAAA <b>Reverse primer (5'-3')</b> CCGAAGTGTATTAGAATCTGCG	55°C	102.59 cM

**Çizelge 7.1. (Devam)** Çalışmada kullanılan SSR markörleri listesi

<b>Kromozom</b>	<b>Marker İsmi</b>	<b>Nükleotid sıralaması</b>	<b>Annealing sıcaklığı</b>	<b>Pozisyon</b>
6	TES1563	<b>Forward primer (5'-3')</b> GAAAAACAGGGGGAAAAAGGA <b>Reverse primer (5'-3')</b> TGCACCACATCAACCTCTTC	55°C	103.46 cM
6	TGS760	<b>Forward primer (5'-3')</b> GAAGAGAACTGAGCAAGGGAAGA <b>Reverse primer (5'-3')</b> TTTTCAGTCATCTCTCCCGC	55°C	56.61 cM
6	TES697	<b>Forward primer (5'-3')</b> CACCACCTGACAACCCTTCT <b>Reverse primer (5'-3')</b> GTTATGCGGTTGGCTTTGTT	55°C	52.39 cM
6	SSR350	<b>Forward primer (5'-3')</b> GGAATAACCTCTAACTGCGGG <b>Reverse primer (5'-3')</b> CGATGCCTTCATTTGGACTT	55°C	101,00 cM
6	SSR47	<b>Forward primer (5'-3')</b> TCCTCAAGAAATGAAGCTCTGA <b>Reverse primer (5'-3')</b> CCTTGGAGATAACAACCACAA	50°C	6,50 cM
6	SSR578	<b>Forward primer (5'-3')</b> ATTCCCAGCACAACCAGACT <b>Reverse primer (5'-3')</b> GTTGGTGGATGAAATTTGTG	55°C	44,00 cM
7	TGS2276	<b>Forward primer (5'-3')</b> GAACCACTTGAACGCAAAG <b>Reverse primer (5'-3')</b> CGTGTTTTGAGGTGGGTTTT	55°C	39.98 cM
7	TGS787	<b>Forward primer (5'-3')</b> GAAATTTTTCGGAAAGGGTCTT <b>Reverse primer (5'-3')</b> CACTTCCCGTTGTAGCCACT	55°C	53.27 cM
7	TGS2303	<b>Forward primer (5'-3')</b> GTTTCCCTATTTTTCATGGCG <b>Reverse primer (5'-3')</b> CCAACGGGTGTTTTCTTTAAC	55°C	96.12 cM
7	SSR45	<b>Forward primer (5'-3')</b> TGTATCCTGGTGGACCAATG <b>Reverse primer (5'-3')</b> TCCAAGTATCAGGCACACCA	50°C	60,00 cM
7	SSR285	<b>Forward primer (5'-3')</b> AGTGGCTCTCCTACTGCG <b>Reverse primer (5'-3')</b> CAATTCTCAGGCATGAAACG	55°C	2,00 cM

**Çizelge 7.1. (Devam)** Çalışmada kullanılan SSR markörleri listesi

Kromozom	Marker İsmi	Nükleotid sıralaması	Annealing sıcaklığı	Pozisyon
8	TES241	<b>Forward primer (5'-3')</b> GTCAATTGACCCAAACAGTATTGA <b>Reverse primer (5'-3')</b> TTTGAAGGTTGGGTTTACCG	55°C	10.97 cM
8	TGS224	<b>Forward primer (5'-3')</b> GTAAAGGCATATGGGGCAGAG <b>Reverse primer (5'-3')</b> AATTTGGGGAGGATTGAGGT	55°C	27.00 cM
8	TGS2819	<b>Forward primer (5'-3')</b> GAACCATGGCTTCTTCTCCCT <b>Reverse primer (5'-3')</b> ACGGACAAGGTCAAATCTGG	55°C	75.37 cM
8	TES1918	<b>Forward primer (5'-3')</b> GTCATTGCTTACGTTGCTGCT <b>Reverse primer (5'-3')</b> ATTCATTTTCTCCGATCCC	55°C	102.09 cM
8	SSR38	<b>Forward primer (5'-3')</b> GTTTCTATAGCTGAACTCAACCTG <b>Reverse primer (5'-3')</b> GGGTTTCATCAAATCTACCATCA	50°C	55,00 cM
8	SSR594	<b>Forward primer (5'-3')</b> TTCGTTGAAGAAGATGATGGTC <b>Reverse primer (5'-3')</b> CAAAGAGAACAAGCATCCAAGA	55°C	55,00 cM
8	SSR335	<b>Forward primer (5'-3')</b> CCTCTCCATTCTGTGGTGGT <b>Reverse primer (5'-3')</b> AACCGTCCTCGATTTACAC	55°C	49,70 cM
8	SSR63	<b>Forward primer (5'-3')</b> CCACAAACAATTCATCTCA <b>Reverse primer (5'-3')</b> GCTTCCGCCATACTGATACG	40°C	61,00 cM
8	SSRB105 694	<b>Forward primer (5'-3')</b> AAAGCCAAAGTGGGAAGAACTCAA <b>Reverse primer (5'-3')</b> CTCGTAAAACGTTTCATCAATCTCGC	53°C	87,00cM
9	TES1183	<b>Forward primer (5'-3')</b> GTTCAACCCCTTTTGCTTTTC <b>Reverse primer (5'-3')</b> ACCCATTCGAAAATCTCTC	55°C	39.15 cM
9	TGS435	<b>Forward primer (5'-3')</b> GCAAAGATCCACATGAACCCC <b>Reverse primer (5'-3')</b> TTGGCCAAACAGGTCCTAAG	55°C	11.81 cM
9	TES889	<b>Forward primer (5'-3')</b> GGAGTTGGGTTTTTCGTTCA <b>Reverse primer (5'-3')</b> ACTCATATCCCCAGACGACG	55°C	99.09 cM

**Çizelge 7.1. (Devam)** Çalışmada kullanılan SSR markörleri listesi

Kromozom	Marker İsmi	Nükleotid sıralaması	Annealing sıcaklığı	Pozisyon
9	SSR73	<b>Forward primer (5'-3')</b> TGGGAAGATCCTGATGATGG <b>Reverse primer (5'-3')</b> TTCCCTTTCCTCTGGACTCA	45°C	32,00 cM
9	SSR69	<b>Forward primer (5'-3')</b> TTGGCTGGATTATTCCTGTTG <b>Reverse primer (5'-3')</b> GCATTTGATAGAAGGCCAGC	50°C	24,90 cM
9	TOM23 6	<b>Forward primer (5'-3')</b> GTTTTTCAACATCAAAGAGCT <b>Reverse primer (5'-3')</b> GGATAGGTTTCGTTAGTGAAC	45°C 50	?
9	SSR70	<b>Forward primer (5'-3')</b> TTTAGGGTGTCTGTGGGTCC <b>Reverse primer (5'-3')</b> GGAGTGCGCAGAGGATAGAG	50°C	42,00 cM
9	SSR599	<b>Forward primer (5'-3')</b> GGATTTCTCATGGAGAATCAGTC <b>Reverse primer (5'-3')</b> TCCCTTGATCTTGATGATGTTG	55°C	109,00 cM
9	SS383	<b>Forward primer (5'-3')</b> ATTGTACAAAGACCCGTGGC <b>Reverse primer (5'-3')</b> GTTGCACACTGGATCAATGC	50°C	57,30 cM
9	SSR333	<b>Forward primer (5'-3')</b> GTTCCCGCTTGAGAAACAAC <b>Reverse primer (5'-3')</b> CCAATGCTGGGACAGAAGAT	50°C	?
10	SSR159	<b>Forward primer (5'-3')</b> ACAACAAAGGCAGCTGGTTC <b>Reverse primer (5'-3')</b> GCTTCCGACAGCCATATAA	50°C	46,00 cM
10	SSR318	<b>Forward primer (5'-3')</b> GCAGAGGATATTGCATTCGC <b>Reverse primer (5'-3')</b> CAAACCGAACTCATCAAGGG	50°C	31,00 cM
10	SSR74	<b>Forward primer (5'-3')</b> ACTCACCATGGCTGCTTCTT <b>Reverse primer (5'-3')</b> TTTCTTGAAGGGTCTTTCCC	55°C	74,00 cM
10	SSR34	<b>Forward primer (5'-3')</b> TTCGGATAAAGCAATCCACC <b>Reverse primer (5'-3')</b> TCGATTGTGTACCAACGTCC	50°C 45	25,30 cM
10	SSR596	<b>Forward primer (5'-3')</b> TTCGGATAAAGCAATCCACC <b>Reverse primer (5'-3')</b> TCGATTGTGTACCAACGTCC	55°C	25,70 cM

**Çizelge 7.1. (Devam)** Çalışmada kullanılan SSR markörleri listesi

<b>Kromozom</b>	<b>Marker İsmi</b>	<b>Nükleotid sıralaması</b>	<b>Annealing sıcaklığı</b>	<b>Pozisyon</b>
10	SSR248	<b>Forward primer (5'-3')</b> GCATTCGCTGTAGCTCGTTT <b>Reverse primer (5'-3')</b> GAGCTTCATCATAGTAACG	50°C	35,00 cM
10	SSR223	<b>Forward primer (5'-3')</b> TGGCTGCCTCTTCTCTGTTT <b>Reverse primer (5'-3')</b> TTTCTTGAAGGGTCTTTCCC	50°C	80,40 cM
10	SSR479	<b>Forward primer (5'-3')</b> TGTAAGAGTGTCTGCCTGCAC <b>Reverse primer (5'-3')</b> ATGGGTTCGGGTTAGCTCTT	52°C	86,00 cM
11	SSR80	<b>Forward primer (5'-3')</b> GGCAAATGTCAAAGGATTGG <b>Reverse primer (5'-3')</b> AGGGTCATGTTCTTGATTGTCA	55°C	20.00
11	TGS346	<b>Forward primer (5'-3')</b> TTCGAGTATATCCCATGCAAA <b>Reverse primer (5'-3')</b> GATAGATCAATCGAGGCGGA	55°C	119.99 cM
11	SSR136	<b>Forward primer (5'-3')</b> GAAACCGCCTCTTTCACTTG <b>Reverse primer (5'-3')</b> CAGCAATGATTCCAGCGATA	50°C	11,00 cM
11	SSR67	<b>Forward primer (5'-3')</b> GCACGAGACCAAGCAGATTA <b>Reverse primer (5'-3')</b> GGGCCTTTCCTCCAGTAGAC	50°C	24,00cM
11	TOM 144	<b>Forward primer (5'-3')</b> CTGTTTACTTCAAGAAGGCTG <b>Reverse primer (5'-3')</b> ACTTTAACTTTATTATTGCGACG	45°C	
12	TES27	<b>Forward primer (5'-3')</b> GAAACAACAAGTGCTGCATGG <b>Reverse primer (5'-3')</b> CTTTTCCATTTATCCCGTAAAA	55°C	21.44 cM
12	TGS209 3	<b>Forward primer (5'-3')</b> GCTTTGGTTGGCTTTCCGATA <b>Reverse primer (5'-3')</b> TTGGCTGTACTIONTTCGGGG	55°C	60.49 cM
12	SSR345	<b>Forward primer (5'-3')</b> AAGCCAAGCTCGAACCTGTA <b>Reverse primer (5'-3')</b> ATCCATGCTGTCGCTTTCAT	60°C	72.50 cM

**Çizelge 7.1. (Devam)** Çalışmada kullanılan SSR markörleri listesi

Kromozom	Marker İsmi	Nükleotid sıralaması	Annealing sıcaklığı	Pozisyon
12	SSR44	<b>Forward primer (5'-3')</b> TCATCTGCAATTCATGGCTC <b>Reverse primer (5'-3')</b> AGGTCAAGGATGTGCTTCCC	45 °C	60,00 cM
?	SSR21	<b>Forward primer (5'-3')</b> GGGTCTCAAAGAAATGGCAC <b>Reverse primer (5'-3')</b> ACGGATCTCAGCCTCAGAAA	50°C	?
?	SSR33	<b>Forward primer (5'-3')</b> GTCTTTACACAATCTCTCACTTGG <b>Reverse primer (5'-3')</b> CTGGTCACTGAACTGCCAGA	55°C	?
?	SSR424	<b>Forward primer (5'-3')</b> AAGGACTTGTGCTGGATTGG <b>Reverse primer (5'-3')</b> TAGTACGCCATGGACCTTCC	55°C	?
?	SSR41	<b>Forward primer (5'-3')</b> TCTCTGAAACGAGACAGAGGAA <b>Reverse primer (5'-3')</b> AGTACGTCTCCCATGGCTGT	55°C	?
?	SSR100	<b>Forward primer (5'-3')</b> GCAAGCCTGTGACAATTGAG <b>Reverse primer (5'-3')</b> GTCGTCGTGTTCCGTCATAA	50°C	?
?	SSR118	<b>Forward primer (5'-3')</b> AGTGGTTCCACTTGTTTAGACC <b>Reverse primer (5'-3')</b> GAATCCGATCTGGGTCAGTG	55°C	?
?	SSR130	<b>Forward primer (5'-3')</b> AAACCCTCAACACCATCACC <b>Reverse primer (5'-3')</b> CATCATTCTTTTCATGGCTCC	50°C	?
?	SSR133	<b>Forward primer (5'-3')</b> CCGTTCTTGGTGGATTAGGA <b>Reverse primer (5'-3')</b> AAAGAGTCAAATGTGCACAGAC	50°C	?
?	SSR142	<b>Forward primer (5'-3')</b> CGAACAGATGCATAGATGAAGA <b>Reverse primer (5'-3')</b> ACGGTGTGGACTCATGTGAA	50°C	?
?	SSR254	<b>Forward primer (5'-3')</b> CCATTGGATAGCGTCTCCC <b>Reverse primer (5'-3')</b> ATTGTGCATGTTGATACCCA	57°C	?

**Çizelge 7.2.** Çalışmada kullanılan INDEL markörleri

<b>Kromozom</b>	<b>Marker İsmi</b>	<b>Nükleotid sıralaması</b>	<b>Annealing sıcaklığı</b>	<b>Pozisyon</b>
1	SL20105_11 93i	<b>Forward primer (5'-3')</b> CTCTCTTCTAAGACCAAAGGTAGC <b>Reverse primer (5'-3')</b> CCGTATTTCTTTATCAGCAAAG	55°C	14.70 cM
1	SL10126_10 67i	<b>Forward primer (5'-3')</b> ATGACTGAGCATCTGCGTTC <b>Reverse primer (5'-3')</b> GCCGCCACTTATTGTAGGAT	55°C	135.00 cM
2	SL10279_32 5i	<b>Forward primer (5'-3')</b> TGATGCCGCAATTACTTTTAG <b>Reverse primer (5'-3')</b> GAAAGCCAAACCAGGATTTTC	55°C	9.10 cM
2	SL10682_37 7i	<b>Forward primer (5'-3')</b> GCCGCTCGTACAAGGTTATTC <b>Reverse primer (5'-3')</b> TCGATTTCCCAAATTGAAGC	55°C	19.40 cM
3	LEOH124i	<b>Forward primer (5'-3')</b> CCGTCTCCTTCTCCCTCTTT <b>Reverse primer (5'-3')</b> CTGGCTGGTGTCTTCTCCAT	55°C	35.10 cM
3	SL10690_11 03i	<b>Forward primer (5'-3')</b> CAAGCAGGTAGCAAAGACTG <b>Reverse primer (5'-3')</b> AAGAAAAGGGAATGTCAGTTTG	55°C	106.10 cM
4	SL10255_34 3i	<b>Forward primer (5'-3')</b> TTTGCTGTATGTATATGCTCTTCC <b>Reverse primer (5'-3')</b> GCACTCTGATAAAAGACTTGCAAG	55°C	24.90 cM
4	SL10888_19 2i	<b>Forward primer (5'-3')</b> AAGCCTCCTTACCAATCAGC <b>Reverse primer (5'-3')</b> GCCATGAAAGTGAAGTGAAGC	55°C	113.70 cM
5	SL20210_88 3i	<b>Forward primer (5'-3')</b> GAGGTATCAAAGTTATGCTTTCAC <b>Reverse primer (5'-3')</b> TCGATTAGTTGAGCTAGTTATTCC	55°C	45.50 cM
5	SL10151_42 6i	<b>Forward primer (5'-3')</b> GCTACAGGCAGACAGCATAGAC <b>Reverse primer (5'-3')</b> CTGCATTCCCTTGTGTTTTC	55°C	42.90 cM

**Çizelge 7.2.(Devam)** Çalışmada kullanılan INDEL markörleri

Kromozom	Marker İsmi	Nükleotid sıralaması	Annealin g sıcaklığı	Pozisyon
6	SL10242_5 11i	<b>Forward primer (5'-3')</b> ATGCGTTATCAGTTTGAGACG <b>Reverse primer (5'-3')</b> CAGATCTGCAGCCTGAAACC	55°C	18.50 cM
8	SL10367_5 33i	<b>Forward primer (5'-3')</b> CTCAAGCTGGTGCTTCTGTC <b>Reverse primer (5'-3')</b> CCCTGGGTCTTCTCCTCTTC	55°C	64.00 cM
9	LEOH170	<b>Forward primer (5'-3')</b> GGATTAGAAGAGAAAAACAAAAG CA <b>Reverse primer (5'-3')</b> AGCCTTCTCAAATTCCTCCTC	55°C	59.90 cM
10	SL10464_1 45i	<b>Forward primer (5'-3')</b> TTTTGCACTAGGAAGCATCG <b>Reverse primer (5'-3')</b> ACATCGCTTCTCACCCTCTC	55°C	31.40 cM
10	SL10386_2 33i	<b>Forward primer (5'-3')</b> TGGAGTTCTGGGTCACCTTG <b>Reverse primer (5'-3')</b> ATAGCCATCCCAAACCACAC	55°C	70.80 cM
11	SL20244_2 52i	<b>Forward primer (5'-3')</b> CCATCTTTTCCGTATACTTCTCC <b>Reverse primer (5'-3')</b> TTGTCCAGAAAGGAAAGGTG	55°C	43.90 cM
11	SL10737_1 414i	<b>Forward primer (5'-3')</b> CCACTCCTGGGACTCAAATC <b>Reverse primer (5'-3')</b> TGGACCCACAGGTAATGAGG	55°C	60.00 cM
12	SL10953_2 59i	<b>Forward primer (5'-3')</b> CTGTCTCTCGCTTTTCTCCTG <b>Reverse primer (5'-3')</b> ACGGAACACACCCTAAGTGC	55°C	21.10 cM
12	SL10329_4 17i	<b>Forward primer (5'-3')</b> TATTGCCTGTGGCACTCTTG <b>Reverse primer (5'-3')</b> TCTTTCCAGGAGACGATTGC	55°C	78.20 cM

## 8. ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Ad- Soyad : Ferhat ÖZDEMİR  
Doğum Tarihi ve Yeri : 1991-Gazipaşa/ANTALYA  
Medeni Durumu : Bekar  
Cep Tel : 531 843 8383  
E-posta : [f.ozdmr07@gmail.com](mailto:f.ozdmr07@gmail.com)

### EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet
Yüksek Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı	2016
Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü	2013
Lise	Gazipaşa Lisesi	2009

### Katıldığı Kongre/Sempozyum/Çalıştay:

- Türkiye Uluslararası 5. Tohumculuk Kongresi ve Sektörel İş Forumu. Sözlü Sunum

### Yayımlar

- 1) Çalış, Ö., Karabulut, D., Karakaş, H., ve Özdemir, F., 2015. Bakteriyel Kanser ve Solgunluk Hastalığına Dayanıklı Domates Genotiplerinde Dayanıklılığın Karakterizasyonu . İç Anadolu 2. Tarım ve Gıda Kongresi, Nevşehir.
- 2) Çalış, Ö., Özdemir, F., Karakaş, H., Karabulut, D., Çelik-Ertekin, D, Saygı, S., Topkaya, Ş., 2014. Domates Genetik Kaynakları Merkezi Tohumlarının Moleküler Dayanıklılık ve Biyoteknoloji Çalışmalarında Kullanılması, Uluslararası Katılımlı Türkiye 5. Tohumculuk Kongresi ve Sektörel İş Formu, 19-23 Ekim Diyarbakır.
- 3) Çalış, Ö., Karakaş, H., Özdemir, F., Karabulut, D., 2014. Bakteriyel Kanser ve Solgunluk Hastalığına Dayanıklı Domates Genotiplerinde Haritalama Çalışmaları, 10. Sebze Tarımı Sempozyumu, 2-4 Eylül Tekirdağ, 89-94.