

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

PATLİCAN TÜRLER ARASI ISLAH GENERASYONLARINDA *FUSARIUM*
OXYSPORUM F. SP. *MELONGENAE* TOLERANSININ VE GEN ETKİLEŞİMLERİNİN
RNA DİZİLEME ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ

Merve Dilek Karataş

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Ali Ergül

Ocak
2023

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Merve Dilek Karataş

İmzası

ONAY

Prof. Dr. Ali Ergül danışmanlığında Merve Dilek Karataş tarafından hazırlanan bu çalışma 12.01.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ali Ergül

İmza:

Üye: Prof. Dr. Gölge Sarıkamış

İmza:

Üye: Prof. Dr. Hilal Özdağ Sevgili

İmza:

Üye: Prof. Dr. Önder Türkmen

İmza:

Üye: Doç. Dr. M. Alp Furan

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Patlıcan Türler arası Islah Generasyonlarında *Fusarium Oxysporum* f. sp. *melongenae*
Toleransının ve Gen Etkileşimlerinin RNA Dizileme Analizi ile Belirlenmesi

Merve Dilek Karataş

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Ali Ergül

Fusarium oxysporum melongenae patlıcanda verimliliği etkileyen biyotik faktörlerden birisidir. Bu tez çalışması kültür türünde bulunmayan bu patojen dayanıklılığını; türler arası melezlemelerle sonraki generasyonlara geçirebilmek, bu generasyonlarda meydana gelen transkripsiyonel düzenlemeler hakkında bilgi edinebilmek amacı ile yapılmıştır.

Solanum melongena ve *Solanum macrocarpon* türleri melezlenmiş; sonrasında kendilemeler yapılarak F2 generasyonu elde edilmiştir. Ana – baba - F1 - F2 generasyonlarında patolojik testlemeler yapıldıktan sonra RNA sekanslama ile transkriptom analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen transkriptler ile generasyonlar boyu, hassas-dayanıklı örnekler arasında karşılaştırmalar yapılmış ortak genler belirlenmiştir. Toplamda 70195 unigen tespit edilmiştir. Gen ontoloji analizi ile katalitik aktivite, hücresel süreç, metabolik süreç gibi biyolojik işlemlerin *Fusarium oxysporum melongenae* patojenine dayanıklılıkta, örnekler arasında farklı şekillerde düzenlendiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile türler arası melezleme ve sonraki generasyonda bitki yapraklarından karşılaştırılabilir bir transkriptom yanıtı elde edilmiştir. Bu RNA dizileme analizi ile elde edilen verilerin patlıcandaki ıslah çalışmalarına önemli ölçüde katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2023, 153 sayfa

Anahtar kelimeler: *Fusarium oxysporum melongenae*, transkriptom, patlıcan

ABSTRACT

PhD Thesis

Determination of *Fusarium oxysporum* f.sp. to *melongenae* Tolerance and Gene Interactions in Eggplant Interspecies Breeding Generations by RNA sequencing analysis

Merve Dilek Karatas

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Ali Ergul

Fusarium oxysporum melongenae is one of the biotic factors affecting productivity in eggplant. The aim of this thesis was to transfer this pathogen resistance, which is not found in cultivated species, to the next generations by interspecific crosses and to obtain information about the transcriptional regulations occurring in these generations.

Solanum melongena and *Solanum macrocarpon* species were crossed and then F2 generation was obtained by selfing. After pathological tests were performed in the parent - F1 - F2 generations, transcriptome analysis was performed by RNA sequencing. With the transcripts obtained, comparisons were made between susceptible and resistant samples across generations and common genes were identified. A total of 70195 unigenes were identified. Gene ontology analysis revealed that biological processes such as catalytic activity, cellular process, metabolic process are regulated differently among the samples in resistance to *Fusarium oxysporum melongenae* pathogen.

As a result, a comparable transcriptome response was obtained from plant leaves in interspecific hybridization and subsequent generations. It is thought that the data obtained by this RNA sequencing analysis will contribute significantly to breeding studies in eggplant.

2023, 153 pages

Keywords: *Fusarium oxysporum melongenae*, transcriptome, eggplant

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının her döneminde benden uzaktan-yakından yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Ali ERGÜL'e katkılarından dolayı çok teşekkür ederim. Tez İzleme komitesi üyeleri olan ve ihtiyaç duyduğum anlarda benden desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Gölge SARIKAMIŞ ve Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ SEVGİLİ'ye teşekkür ederim.

Tez çalışmasında bitkilerimin yetiştirilmesinde bana destek olan Tokat Gaziosman Paşa Üniversitesi Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne, patojen inokülasyonu konusunda bana yardımcı olan Araş. Gör. Funda ŞAHİN'e katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamda benden desteklerini esirgemeyen, ihtiyaç duyduğum her an bana yardımcı olan Dr. Canan YÜKSEL ÖZMEN'e, biyoinformatik analizlerde benden bilgisini esirgemeyen Dr. Umut KİBAR'a, beraber doktora eğitimine başladığım ve aynı laboratuvarında çalışmaktan mutlu olduğum Arş. Gör. Dr. Serdar ALTINTAŞ'a, tez çalışmamda benden bilgisini esirgemeyen Zir. Yük. Müh. Onur ERGÖNÜL'e teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresince bana rahat bir çalışma ortamı sağlayan Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'ne ve tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Doktora sürecim boyunca beni anlayışla karşılayan birlikte çalışmaktan mutlu olduğum, Ankara Üniversitesi'ne görevlendirmelerim esnasında beni destekleyen Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dekanlığı'na ve Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'ne teşekkür ederim.

Bana hayatımın her aşamasında yol gösteren, her zaman arkamda olduğunu bildiğim; tez çalışmamda da benden bilgi birikimini esirgemeyen canım babam Naif GEBOLOĞLU'na, fedakarlığın bana ne olduğunu gösteren, her durumda benim yanımda ve arkamda olan canım annem Ceyhan GEBOLOĞLU'na, bir kardeşin ne demek olduğunu sayesinde öğrendiğim bitanecik kardeşim Nilşah YILMAZ'a en kalbi duygularımla teşekkür ederim.

Hayatımda olduğu için kendimi çok şanslı hissettiğim, her zaman destekçim olan hayat arkadaşım, sevgili eşim Boran KARATAŞ'a destekleri ve bu süreçte bana göstermiş olduğu sabır ve özveri için teşekkür ederim.

Hayatımın anlamı, varlığı en büyük şansım olan evimizin neşe kaynağı canım oğlum Mert Aren KARATAŞ'a en kalbi duygularımla teşekkür ederim.

2023

Merve Dilek Karataş



İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN.....	i
ONAY	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
SEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. PATLICANIN ORJİNİ, YETİŞTİRİLMESİ, KÜLTÜRE ALINMASI	3
2.2. PATLICANIN MEYVE ÖZELLİKLERİ YÖNÜNDEN ÇEŞİTLİLİĞİ	6
2.3. PATLICANIN EKOLOJİK İSTEKLERİ	7
2.4. PATLICANIN BESİN DEĞERİ VE SAĞLIK AÇISINDAN ÖNEMİ	8
2.5. DÜNYADA VE TÜRKİYE’DE PATLICAN YETİŞTİRİCİLİĞİNİN DURUMU.....	9
2.6. PATLICANDA BİYOTİK STRES	12
2.7. PATLICANDA ABİYOTİK STRES	14
2.8. PATLICANDA AŞILAMA.....	15
2.9. PATLICANDA TÜRLER ARASI MELEZLEME	16
2.10. <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i>	18

2.11. <i>FUSARIUM OXYSPORUM MELONGENAE</i>	21
2.12. <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> F.SP. <i>MELONGENAE</i> DAYANIKLILIK KAYNAKLARI	23
2.13. <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> İLE MÜCADELE	24
2.14. DNA DİZİLEME TEKNOLOJİSİ	26
2.14.1. Birinci Nesil Dizileme Teknolojisi.....	26
2.14.2. İkinci Nesil Dizileme Teknolojisi (Yeni Nesil Dizileme).....	27
2.14.3. Üçüncü Nesil Dizileme Teknolojisi	28
2.15. TRANSKRİPTOM DİZİLEME.....	30
2.16. RNA-SEQ DİZİLEME BASAMAKLARI	31
2.17. ILLUMİNA	32
2.18. TRANSKRİPTOM DİZİLEME TEKNOLOJİSİ İLE HEDEF GENLERİN BELİRLENMESİ.....	32
3. GEREKÇE VE AMAC	34
4. MATERYAL VE YÖNTEM	35
4.1. MATERYAL	35
4.2. YÖNTEM	36
4.2.1. DTG VE HYÇ BİTKİLERİN YETİŞTİRİLMESİ.....	36
4.2.2. DTG VE HYÇ BİTKİLERİN MELEZLENMESİ	37
4.2.3. PATOJEN TESTLEMESİNDE KULLANILACAK OLAN FOMG İZOLATLARININ TEMİNİ VE ÇOĞALTILMASI.....	38
4.2.4. DTG - HYÇ-F1 BİTKİLERİNİN KLASİK PATOJENİTE TESTLEMELERİ .	39
4.2.5. PATOJENİTE TESTLEMELERİ SONUCUNDA EN İYİ DAYANIKLILIK GÖSTEREN F1 KOMBİNASYONLARININ BELİRLENMESİ	40
4.2.6. PATOJENİTE TESTLEMELERİ SONUCUNDA EN YÜKSEK DAYANIKLILIK GÖSTEREN F1 BİTKİLERİNİN YETİŞTİRİLMESİ VE KENDİLEMELERİN YAPILMASI.....	42

4.2.7.	DTG, HYÇ, F1 VE F2 BİTKİLERİNİN YETİŞTİRİLMESİ.....	43
4.2.8.	DTG, HYÇ, F1 VE F2 BİTKİLERİNE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> İZOLATININ İNOKULASYONU.....	43
4.2.9.	İNOKULASYONDAN SONRA DAYANIKLI - HASSAS F2 BİTKİLERİNİN BELİRLENMESİ.....	44
4.2.10.	DAYANIKLI - HASSAS F2, 1 ADET DAYANIKLI F1, ANA - BABA BİTKİ KÖKLERİNDEN RNA İZOLASYONU.....	45
4.2.11.	İZOLE EDİLEN RNA'LARIN MİKTAR - KALİTE KONTROL ÖLÇÜMLERİNİN YAPILMASI.....	46
4.2.12.	RNA DİZİLEME (RNA-SEQ = RNA SEQUENCİNG).....	47
4.2.12.1.	Transkriptom Dizileme İçin Kütüphane Hazırlığı.....	48
4.2.12.2.	Kümeleme ve Sekanslama.....	48
4.2.13.	BİYOİNFORMATİK ANALİZLER.....	49
4.2.13.1.	Kalite Kontrol.....	49
4.2.13.2.	Transkriptom Birleştirmeleri.....	49
4.2.13.3.	Gen Fonksiyonel Annotasyonu.....	50
4.2.13.4.	Gen Ekspresyon Seviyelerinin Ölçümü.....	50
4.2.13.5.	Farklı Ekspresyon Analizi (DEG: differentially expressed gene).....	50
4.2.13.6.	GO (Gen Ontolojisi) Zenginleştirme Analizi.....	51
4.2.13.7.	KEGG Yolak Zenginleştirme Analizi.....	51
4.2.13.8.	PPI (Protein-protein etkileşimi).....	51
5.	<u>ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	52
5.1.	DTG (DAYANIKLI TÜRE AİT GENOTİP) VE HYÇ (HASSAS YERLİ ÇEŞİT) BİTKİLERİNİN MELEZLENMESİ.....	52
5.2.	İZOLE EDİLEN RNA'LARIN KALİTE VE MİKTAR ÖLÇÜM DEĞERLERİ.....	52
5.3.	İZOLE EDİLEN RNA'LARA AİT JEL GÖRÜNTÜSÜ.....	53
5.4.	İZOLE EDİLEN RNA'LARA AİT RIN (RNA INTEGRİTY NUMBER / RNA BÜTÜNLÜK DEĞERİ) DEĞERLERİ.....	53

5.5. RNA DİZİLEME VERİLERİNDE YAPILAN ANALİZLER.....	54
5.5.1. Ham Veri ve Net Veri.....	54
5.5.2. Transkriptom Birleştirilmesi ve Dağılımı	56
5.6. RNA Dizilemelerinde Genlerin Fonksiyonel Analizi.....	58
5.7. RNA Dizilemelerinde Referans Oluşturma ve İfade Analizleri	63
5.8. RNA Dizilemeleri Sonucunda İfade Edilen Transkriptlerin Örnekler Arasında Karşılaştırılması	67
5.8.1. Ana – Baba arasındaki artan azalan genler.....	67
5.8.2. Ana – Hassas F2 arasındaki artan azalan genler.....	69
5.8.3. Baba – Dayanıklı F1 arasındaki artan azalan genler	71
5.8.4. Baba – Dayanıklı F2 arasındaki artan azalan genler	73
5.8.5. Dayanıklı F1 – Dayanıklı F2 arasındaki artan azalan genler.....	75
5.8.6. Dayanıklı F2 – Hassas F2 arasındaki artan azalan genler	77
5.9. Örneklere ait Korelasyonlar	79
5.10. Örneklere ait Heatmap Analizleri.....	84
<u>6. TARTIŞMA VE SONUC</u>	<u>85</u>
<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>97</u>
<u>ÖZGEÇMİŞ.....</u>	<u>110</u>
<u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>113</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Nei ve Li genetik benzerlik kullanılarak UPGMA’da <i>Solanum</i> türlerinin dendogramı (14).	4
Şekil 2.2. <i>Solanum melongena</i> ’nın akraba türleri.	5
Şekil 2.3. <i>Fusarium solgunluğundan</i> etkilenen patlıcan bitkilerine ait genel bir görüntü (tez çalışması esnasında kullanılan bitkilerde).	22
Şekil 4.1. Tez çalışmasında ana olarak kullanılan Anamur çeşidi, baba olarak kullanılan <i>Solanum macrocarpon</i> türü (soldan sağa).....	35
Şekil 4.2. <i>Solanum integrifolium</i> , <i>Solanum anguivi</i> ’ye ait resimler (soldan sağa).	36
Şekil 4.3. Çalışmanın yapıldığı seraya ait fotoğraflar.	36
Şekil 4.4. Patlıcan çiçeğine ve melezleme çalışmalarına ait fotoğraf.	38
Şekil 4.5. <i>Fusarium oxysporum melongenae</i> ’nın PDA’daki makroskopik ve mikroskopik görüntüsü.	39
Şekil 4.6. Patojen uygulamasına ait fotoğraflar (Sırasıyla: köklerin çeşme suyunda yıkanması, traşlanarak yara dokusunun oluşturulması, patojen solüsyonunda bekletilmesi).	40
Şekil 4.7. Skorlamalar sonucu dayanıklı olduğu belirlenen kombinasyonlara ait bitkilerin fotoğrafları (Sırasıyla: Anamur F2 X <i>S. aethiopicum Gilo</i> , Pala X <i>S. aethiopicum Gilo</i> , Anamur F4 X <i>S. macrocarpon</i>).	42
Şekil 4.8. Viyollerde yetiştirilen Anamur F4 X <i>S. macrocarpon</i> F2 bitkilerine ait fotoğraflar.	43
Şekil 4.9. Patojen uygulamasına ait fotoğraflar (Sırasıyla: köklerin çeşme suyunda yıkanması, patojen solüsyonunda bekletilmesi).	44
Şekil 4.10. İnokulasyondan sonra hastalık belirtilerinin başladığı dönemde viyollerdeki Anamur X <i>S. macrocarpon</i> F2 bitkilerine ait görüntüler.	45
Şekil 4.11. Biyoinformatik analiz aşamaları.	49
Şekil 5.1. 9 adet RNA’ya ait agaroz jel görüntüsü.....	53
Şekil 5.2. Ana, Ana (biyolojik tekrar), Ana (biyolojik tekrar) örneklerinde ham veriye uygulanan veri kalite sonuçları (N: veride bilinmeyen %10’dan fazla nükleotid bulunması, Düşük kalite (low quality): okunan dizide %50 oranından (baz kalitesinin 20’den az olması) az kaliteli okuma bulunması).....	55
Şekil 5.3. Baba, Baba (biyolojik tekrar), Baba (biyolojik tekrar) örneklerinde ham veriye uygulanan veri kalite sonuçları (N: veride bilinmeyen %10’dan fazla nükleotid bulunması,	

Düşük kalite (low quality): okunan dizide %50 oranından (baz kalitesinin 20'den az olması) az kaliteli okuma bulunması).....	55
Şekil 5.4. Dayanıklı F1, Hassas F2, Dayanıklı F2 örneklerinde ham veriye uygulanan veri kalite sonuçları (N: veride bilinmeyen %10'dan fazla nükleotid bulunması, Düşük kalite (low quality): okunan dizide %50 oranından (baz kalitesinin 20'den az olması) az kaliteli okuma bulunması).	55
Şekil 5.5. Unigene uzunluk dağılımları ve sayıları.	57
Şekil 5.6. Unigene/transkript uzunluk dağılımları ve sayıları.....	57
Şekil 5.7. Transkript uzunluk dağılımları ve sayıları.	58
Şekil 5.8. Veri tabanlarına yönelik anotasyon dağılımları.	60
Şekil 5.9. a) a) Anotasyonu yapılan verinin sayısının değişik veri tabanlarına göre venn diagram dağılımı, b) Anotasyonu yapılan verinin değişik organizmalara yönelik benzerlik dağılımı.....	60
Şekil 5.10. Gen ontoloji anotasyonu.....	61
Şekil 5.11. KOG'a anote edilen genlerin sınıflandırılması.	62
Şekil 5.12. KEGG'e anotasyonu yapılan genlerin sınıflandırılması.....	63
Şekil 5.13. Örneklerle ait FPKM dağılımı.....	64
Şekil 5.14. İfade olan genlerin RNA dizileme örneklerine göre farklı ve kesişen dağılımlarının venn diagramı.....	65
Şekil 5.15. Baba ve Ana örneklerinde ifade olan genlerin kesişen dağılımlarının venn diagramı.	66
Şekil 5.16. Hassas F2 ve Dayanıklı F2'de ifade olan genlerin kesişen dağılımlarının venn diagramı.	66
Şekil 5.17. 9 adet örneğe ait korelasyonlar.....	80
Şekil 5.18. Ana ve Baba & Ana ve Dayanıklı F2 örneklerinin Volcano plot analizleri.....	81
Şekil 5.19. Baba ve Dayanıklı F1 & Ana ve Dayanıklı F1 örneklerinin Volcano plot analizleri.	81
Şekil 5.20. Ana ve Hassas F2 & Baba ve Dayanıklı F2'nin Volcano plot analizleri.	82
Şekil 5.21. Dayanıklı F1 ve Dayanıklı F2 & Baba ve Hassas F2'nin Volcano plot analizleri.	82
Şekil 5.22. Hassas F2 ve Dayanıklı F2 & Dayanıklı F1 ve Hassas F2'nin Volcano plot analizleri.	83
Şekil 5.23. 9 adet örnekte genlerin ekspresyon seviyelerine göre ısı haritası.	84

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Solanaceae familyasına ait önemli sebzelerin ekilen alan miktarları (FAO, 2017).....	9
Çizelge 2.2. Dünyadaki patlıcan üretim alanlarının ve üretim miktarlarının bölgeler arasındaki dağılımı.	10
Çizelge 2.3. Önemli patlıcan üreticisi ülkelerin yıllara göre üretim alanları ve üretim miktarları.	10
Çizelge 2.4. Türkiye’de yıllara göre patlıcan üretim miktarı (41).....	11
Çizelge 2.5. Türkiye’de bazı illerdeki patlıcan üretim alanları ve üretim miktarları (2021 yılı).	12
Çizelge 2.6. Patlıcanda hastalığa sebep olan etmenler ve sebep oldukları hastalıklardan bazıları.	13
Çizelge 2.7. Birinci, ikinci ve üçüncü nesil dizilemeler arasındaki farklar (114).	29
Çizelge 2.8. Bazı yeni nesil DNA dizileme platformlarının karşılaştırılması (124).	30
Çizelge 2.9. RNA-Seq ile mikroarray ve cDNA/EST’nin karşılaştırılması (127, 128).	31
Çizelge 4.1. HYÇ ve DTG melezleme kombinasyonları ve melezleme sayısı.....	38
Çizelge 5.1. Çalışmada kullanılan HYÇ ve DTG melezleme kombinasyonları, yapılan melezleme sayıları, meyve tutum oranı, elde edilen tohum sayıları.....	52
Çizelge 5.2. İzole edilen RNA’lara ait kalite ve miktar ölçümleri.....	53
Çizelge 5.3. RNA örneklerine ait RIN değerleri.....	54
Çizelge 5.4. Değişik Phred ve Q skorlarına göre hatalı baz/doğru okuma oranları.....	54
Çizelge 5.5. Örnekler bazında elde edilen ham ve kullanılabilir net veri sonuçları.....	56
Çizelge 5.6. Transkript ve unigene’lerin uzunluk dağılımları ve sayıları.....	57
Çizelge 5.7. Veri tabanlarına yönelik unigene sayıları.....	59
Çizelge 5.8. Toplam (net) okumalar ve ref’e tekrar haritalanması sonucu elde edilen transkriptom sayıları.....	64
Çizelge 5.9. Örnekler arasında artan – azalan genlerin karşılaştırılması.....	65
Çizelge 5.10. Ana – baba örnekleri arasında ifadesi en çok artan 40 gene ait bilgiler.....	68
Çizelge 5.11. Ana – baba örnekleri arasında ifadesi en çok azalan 40 gene ait bilgiler.....	69
Çizelge 5.12. Ana – Hassas F2 örnekleri arasında ifadesi en çok artan 40 gene ait bilgiler.....	70
Çizelge 5.13. Ana – Hassas F2 örnekleri arasında ifadesi en çok azalan 40 gene ait bilgiler.....	71

Çizelge 5.14. Baba – Dayanıklı F1 örnekleri arasında ifadesi en çok artan 40 gene ait bilgiler.....	72
Çizelge 5.15. Baba – Dayanıklı F1 örnekleri arasında ifadesi en çok azalan 40 gene ait bilgiler.....	73
Çizelge 5.16. Baba – Dayanıklı F2 örnekleri arasında ifadesi en çok artan 40 gene ait bilgiler.....	74
Çizelge 5.17. Baba – Dayanıklı F2 örnekleri arasında ifadesi en çok azalan 40 gene ait bilgiler.....	75
Çizelge 5.18. Dayanıklı F1 – Dayanıklı F2 örnekleri arasında ifadesi en çok artan 40 gene ait bilgiler.....	76
Çizelge 5.19. Dayanıklı F1 – Dayanıklı F2 örnekleri arasında ifadesi en çok azalan 40 gene ait bilgiler.....	77
Çizelge 5.20. Hassas F2 - Dayanıklı F2 örnekleri arasında ifadesi en çok artan 40 gene ait bilgiler.....	78
Çizelge 5.21. Hassas F2 - Dayanıklı F2 örnekleri arasında ifadesi en çok azalan 40 gene ait bilgiler.....	79

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Derece
%	Yüzde
α	Alfa
β	Beta
18-28S	Svedberg
μ l	Mikrolitre
AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (Amplified Fragment lenght Polimorphism)
BC1	Geri melezleme (Back cross)
bç	Baz çifti
BP	Biyolojik Süreç
CAMP	Siklik Adenosinmonofosfat
CC	Hücrel Komponent
cDNA	Complementer/tamamlayıcı DNA
cm	Santimetre
COG	Ortolog Protein Gruplarının Sınıflandırılması
DDBJ	Japonya DNA Veri Bankası
DEG	Farklı Ekspresyon Analizi (Differentially Expressed Gene)
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotit trifosfat
dk	Dakika
DTG	Dayanıklı Türe ait Genotip
EMBL	Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı
EST	Eksprese Edilmiş Dizi Etiketi (Expressed Sequence Tag)
ETOH	Ethanol
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization)

<i>Fomg</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melongenae</i>
FPKM	Milyon Kilobazdaki Fragment Miktarı (Expected Number of Fragment per Kilobase of Transcript Dequence per Millions Base Pairs Sequenced)
f.sp	Forma specialis
GC	Guanin Sitozin
GISH	Genomik in situ Hibridizasyon (Genomic in situ hybridization)
GO	Gen Ontoloji
gr.	Group
ha	Hektar
HYÇ	Hassas Yerli Çeşit
ITS	Internal Transcribed Spacer
K	Potasyum
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KO	KEGG Ortolog Veritabanı
KOG	Eukaryotic Orthologous Groups
M	Molar
MAS	Markır Destekli Seleksiyon (Marker Assisted Selection)
Mb	Mega Bases
MF	Moleküler Fonksiyon
mg	Miligram
ml	Mililitre
MLP	Mjor Lateks Protein
mRNA	Mesajcı RNA
MtBr	Metil Bromür
N	Azot
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
ng	Nanogram

Nr	NCBI Protein Verisi
Nt	NCBI Nükleotid verisi
QTL	Kantitatif Karakter Lokusu (Quantitative Trait Locus)
P	Fosfor
PDA	Patates Dextroz Agar
PDB	Protein Veri Bankası
Pfam	Protein Ailesi
pH	Potansiyel Hidrojen (Power of Hydrogen)
PIR	Protein Bilgi Merkezi
PKA	Protein Kinaz A
PolyA	Poly Adenin
PolyT	Poly Timin
PPi	Pirofosfat
PR	Patojen ile ilişkili proteinler
PRF	Protein Araştırma Kuruluşu
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qRT-PZR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Polimorfik DNA'nın Rastgele Amplifikasyonu (Random Amplification of Polymorphic DNA)
RNA	Ribo Nükleik Asit
RIN	RNA Integrity Number (RNA Bütünlük Değeri)
RNA-Seq	RNA Sekanslama-Dizileme
RPKM	Bir Gene Haritalanmış Olan Okuma Sayısı: Read of Per Kilobase Exon Per Million Reads
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı (Rounds Per Minute)
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
SMRT	Tek moleküllü - Gerçek zamanlı (Single Molecule, Realtime)
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)

spp.	Tür
SSH	Çıkarım Hibridizasyon (Supression Subtractive Hybirdzation)
TBE	Tris-borate-EDTA
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UTP	Uridin Trifosfat
vb	Ve benzerleri
VCG	Vejetatif uyumluluk grubu
vs	Vesaire
YND	Yeni Nesil Dizileme
ZMW	Zero-mode waveguide

1. GİRİŞ

Farklı ülkelerde farklı isimlerle adlandırılan patlıcan, Solanaceae familyasından *Solanum* cinsine, *Leptostemonum* alt cinsine ait bir sebze türüdür. Türün yetiştiriciliği, ılıman ve tropikal ülkelerde yaygın olmakla beraber; patlıcan Orta Doğu ve Akdeniz havzası dahil dünya üzerinde oldukça yaygın yetiştirilmektedir (1). Patlıcan büyüme döneminde çeşitli bitki hastalıklarına maruz kalmaktadır. *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* patlıcanda önemli verim ve kalite kayıplarına neden olan fungal bir etmendir. Ülkemizde ise ilk olarak 2005 yılında tespit edilmiştir. *Fusarium oxysporum*, ürettiği sporlar aracılığı ile toprakta kalıcılığını uzun süre koruyabilmektedir; bu da etmenle mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Hastalık etmeni ile mücadelede nadas uygulaması, toprağa buhar uygulaması, fungusit kullanımı, aşılama gibi yöntemler uygulansa da hastalıkla mücadelede en etkili yöntemin dayanıklı çeşit kullanımı olduğu görülmektedir (2, 3). Patojenle mücadelede aşılama anaç olarak kullanılan genotiplerde dayanıklılık gözlenmekle birlikte günümüzde yetiştiriciliği yapılan ticari patlıcan çeşitlerinde hastalığa dayanıklılık bildirilmemiştir (4). Patlıcanda *Fusarium oxysporum* etmenine dayanıklılık genel olarak yabani türlerde görülmektedir. Etmene karşı dayanıklılık kazandırmak için kültür türüne ait çeşitlerin meyve özellikleri korunarak; yabani yakın akraba türlerden melezleme çalışmaları ile dayanıklılık genlerinin çeşitlere aktarımı sağlanabilmektedir.

Ancak çeşit geliştirme aşamalarında yapılan melezlemeler sonucu ortaya çıkan yeni genetik yapı generasyonlar boyunca değişmektedir. Ana-baba ebeveynlerin yanında melez generasyonlardaki genom yapısı (gen dağılımları ve fonksiyonları) hibrit bitkilerdeki dayanıklılık göstergesi olarak ön plana çıkmaktadır. Hibrit bitkilerdeki genom boyu gen dağılımlarının belirlenmesi ise dayanıklı-hassas genomlardaki açılımları, değişimleri ortaya koyucu bulguları oluşturmaktadır. Bu yönlü genom boyutlu verilerin eldesi ise son yıllarda kullanıma giren yeni nesil dizileme teknolojileri kullanılarak özellikle RNA dizileme çalışmaları ile yapılmaktadır.

Biyotik streslere dayanıklı çeşit geliştirme çalışmaları dünyada olduğu gibi ülkemizde de öncelikli araştırma konularındandır. Ancak *Solanum melongena*'da ve yabani türlerde değişik genetik çalışmalar bulunmakla birlikte *Fomg* dayanıklılığına yönelik kısıtlı sayıda transkriptom çalışması yürütülmüştür.

Fusarium oxysporum f. sp. *melongenae*'ya dayanıklı çeşit geliştirmeye yönelik kullanılabilecek türler arası ıslah hatlarının belirlenmesi ve seçilmesi diğer taraftan bu ıslah generasyonları boyunca genom düzeyinde yapısı/varyasyonu izlenerek belirlenecek gen adaylarının tespit edilmesi uzun süren dayanıklılık ıslahı çalışmalarına hem klasik hem de moleküler ıslah düzeyinde katkılar sunacaktır.

Bilgilerimiz dahilinde ilk olarak gerçekleştirilen bu çalışma ile *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* enfeksiyonu koşullarında ülkemizde yaygın tüketilen Anamur çeşidi, *Fomg* dayanıklı *S. macrocarpon* türü, F1 ve F2 hatlarında, *S. macrocarpon* türünün dayanıklılığında rol olan genler ve bu genlerin kalıtımı genom boyu RNA dizileme çalışmaları ile belirlenmiştir.

Yürütülecek klasik ıslah ve moleküler ıslah çalışmalarına ışık tutacak bu tez çalışmasının sonuçlarında da yabani - kültür türlerinin melezlenmeleri sonucunda elde edilen F2 hibritlerinde genom boyutunda gen etkileşimlerinin ana-babaya göre hangi düzeyde gerçekleştiği, enfeksiyon koşullarında yabani türe özel indüklenen ve ifadesi azalan genlerin sayıları, yerli patlıcana özel gen sayısı ve gen etkileşimlerinin yabani türe göre nasıl farklılık gösterdiği ortaya konulabilir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. PATLICANIN ORİJİNİ, YETİŞTİRİLMESİ, KÜLTÜRE ALINMASI

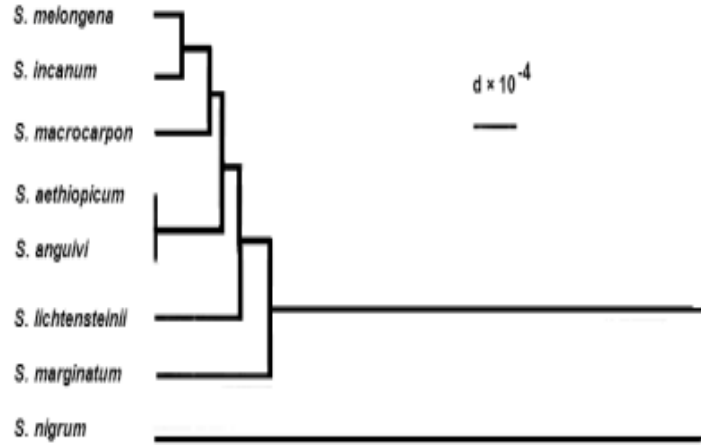
Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, Avrupa’da ‘aubergine’, Güney Asya ve Güney Afrika’da ‘brinjal’ olarak bilinen Patlıcan Solanaceae familyasının *Solanum* cinsine aittir. Patlıcanın dahil olduğu Solanaceae familyası 90 cins ve yaklaşık 2500 tür barındırmaktadır. *Solanum* cinsi altında 13 tür bulunmaktadır. Patlıcan bunlardan ‘*Leptostemonum*’ alt cinsinde yer almaktadır (5-7).

Patlıcan ilk olarak aynı cinste yer alan patates (*Solanum tuberosum* L.), domates (*Solanum lycopersicum* L.) gibi Asya’da kültüre alınmıştır (6). Patlıcanın orijini ile ilgili birçok teori ortaya atılmıştır. Genel teori Afrika / Orta Doğu’daki patlıcan türü olan *S. incanum*’dan *S. melongena*’nın türetildiği yabancı atası olan *S. insanum*’dan evrimleştiği Hindistan - Çin’e taşındığıdır (7, 8). Hindistan’da ‘brinjal’ olarak adlandırılan patlıcan, ılıman ve tropikal Asya ülkelerinde yaygın olarak yetiştirilmekle birlikte, Orta Doğu ve Akdeniz havzası başta olmak üzere dünya genelinde yetiştiriciliği yapılan sebze türlerinden birisidir (1). Patlıcan Asya ülkelerinden Anadolu aracılığıyla tüm Avrupa’ya yayılmıştır. Türkiye’de 17. yüzyıldan beri patlıcan yetiştiriciliği yapılmaktadır. Araştırmacılara göre; *S. melongena*’nın kökeni Hindistan ve Çin’in güneydoğusunda kültüre alınan *S. incanum* olabilir. *S. aethiopicum* ve *S. macrocarpon* patlıcanın diğer yabancı akrabaları olan *S. anguivi* ve *S. dasycyllum*’dan kültüre alınmıştır.

Brinjal patlıcan (*Solanum melongena* L.) Solanaceae familyasına ait *Solanum* cinsinin 1300 türünden birisidir. Solanaceae familyası 10 cinsten oluşmaktadır (9). Solanaceae familyasındaki genetik çeşitlilik Amerika kıtasında yoğunlaşmaktadır (10).

20. yüzyılın sonlarında patlıcan ve yabancı akrabalarına bakıldığında *S. melongena* ve *S. incanum* olarak 2 gruba ayrılmıştır. Bu sınıflandırmada morfolojik benzerliklerden yararlanılmıştır. Bu taksonomik çalışma daha genel bir filogenetik çalışmayla birleştirildiğinde 13 tür daha tanımlanmıştır (5, 11).

Araştırmacılar *S. melongena*’nın orijininin Afrika olduğunu ve buradan Asya’ya yayıldığı şeklindeki hipotezi test etmişler, çıkan sonuçlar hipotezi desteklemiş; ayrıca başka bir Afrika türünün de (*S. linneanum*) grubun bir üyesi olduğunu belirtmişlerdir (12, 13).

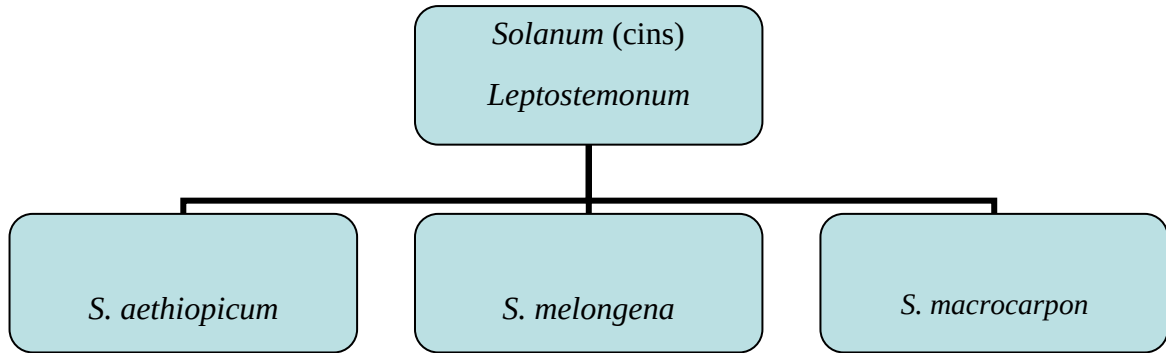


Şekil 2.1. Nei ve Li genetik benzerlik kullanılarak UPGMA’da *Solanum* türlerinin dendrogramı (14).

1997 yılında patlıcanda yapılan taksonomi çalışmasının sonucunda *Solanum* türlerinin Nei ve Li genetik benzerliğine dayalı UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) dendrogramı Şekil 2.1.’de sunulmuştur (15). Bu çalışmaya göre, *S. incanum* ve *S. macrocarpon* oldukça yakın türlerdir. Dendrograma bakıldığında, *S. aethiopicum* ile *S. anguivi*’nin yakın türler olduğu, *S. macrocarpon*’un *S. melongena* ve *S. incanum* ile yakın benzerlik gösterdiği görülmektedir. *S. melongena* – *S. incanum* ve *S. incanum* arasındaki genetik benzerlik 1995 yılında başka araştırmacılar tarafından da izoenzim elektroforez çalışmalar ile belirlenmiştir (16). *S. melongena* ve *S. incanum* arasındaki yakın ilişki ise RAPD tekniği kullanılarak da farklı araştırmacılar tarafından belirlenmiştir (17). AFLP markırlarıyla yapılan başka bir çalışmanın sonuçlarına göre *S. macrocarpon*, *S. aethiopicum* ile *S. melongena* daha çok benzer bulunmuştur (18, 19).

Bu literatürlerin ışığında, patlıcanın Asya’dan Afrika’ya tek bir yayılımla geldiği, sonrasında evrimleştiği; patlıcanın yabani akrabalarındaki çeşitliliğin ise sonrasında ve Afrika’nın kendi içerisinde meydana geldiği anlaşılmaktadır. Biyocoğrafik dendrogram analizine göre patlıcan türünün kökeni Afrika ve Ortadoğu olup, güneye ve doğuya buralardan yayılmıştır (13).

Patlıcanın *Solanum* cinsine ait 3 yakın akrabası vardır: Bu türler: *S. aethiopicum*, *S. melongena*, *S. macrocarpon*'dur (Şekil 2.1.).



Şekil 2.2. *Solanum melongena*'nın akraba türleri.

Gboma patlıcanı olarak da bilinen *S. macrocarpon*, Afrika'da yetiştirilen *S. dasypyllum*'dan meydana gelmiştir (20). Bugüne kadar yapılan filogenetik çalışmalara bakıldığında *S. dasypyllum* ile *S. macrocarpon*'un yakın akraba olduğu görülmektedir (21). *S. macrocarpon* 50 X 30 cm boyutunda tüysüz yapraklı yeşil bir sebzedir. Meyveleri büyük, 3 – 10 cm çapında, 2 – 6 cm uzunluğunda krem beyazı, yeşil-beyaz veya yeşil renktedir. Meyveleri *S. aethiopicum*'a göre daha tatlıdır. Meyveler tam olgunluğa geldiğinde sarararak renkleri turuncu veya kahverengiye dönmektedir (14).

S. aethiopicum Afrika'da yaprakları ve meyveleri için yetiştirilmekte ve diğer kültür türlerinden ekocoğrafik olarak ayrılmaktadır (22). *S. aethiopicum* çoğunlukla Brezilya ve Asya'da yetiştirilmekte ve buralarda 'Gilo' olarak bilinmektedir. Genellikle yeşil aksamaları yenilmektedir. *S. anguivi* ile Afrika'daki yabani akrabaları *S. aethiopicum* arasındaki benzerliğe bakıldığında ise morfolojik olarak yakın oldukları görülmüştür. Fakat filogenetik analizlerde bu iki türün yakın genetik ilişkili olmadıkları görülmüştür (11, 21).

Afrika patlıcanı olarak bilinen *S. aethiopicum* ve *S. macrocarpon* Batı ve Orta Afrika'daki en popüler yerli geleneksel sebzelerden biridir. Ancak bu türlerin verimi - yetiştirme alanları ile ilgili verilerin yetersiz olması nedeni ile bilgilerin istatistik olarak değerlendirilmesi sınırlıdır (14). *S. aethiopicum* çoğunlukla Güney Amerika'da *S. macrocarpon* ise Asya ve Amerika'da yaygın olarak yetiştirilmektedir.

Patlıcan, domates ve biber gibi kendine döllen diploid ($2n=24$) bir bitki olup; 24 kromozomludur. Patlıcanın çekirdek genomunun büyüklüğü yaklaşık 1100 Mb'dir (23). Patlıcan ismini yumurtaya benzer yapısından almıştır. Domates cDNA, genomik DNA,

EST markırlarına dayanarak *S. melongena* moleküler genetik bağlantı haritası çıkarılmıştır (14, 23).

Patlıcan genetik kaynakları genellikle bazı Avrupa ve Asya ülkelerinde toplanmıştır. Dünya çapında patlıcan gen kaynaklarına ayrılmış bir koleksiyon bulunmamaktadır. Koleksiyonlara yönelik yürütülen EGGNET, bu konuda Avrupa’ da yürütülen bir projedir ve farklı ortaklardan oluşmaktadır. EGGNET, tüm Avrupa koleksiyonlarını birbirine bağlamakta ve 1700’den fazla *S. melongena*, 750 *S. aethiopicum* ve 210 *S. macrocarpon* materyali içermektedir (24).

2.2. PATLICANIN MEYVE ÖZELLİKLERİ YÖNÜNDEN ÇEŞİTLİLİĞİ

Patlıcan türleri çeşitli morfolojik özelliklere sahiptir. Meyve şekli, meyve rengi patlıcanlar arasında farklılık gösteren önemli özelliklerdendir (25, 26). Patlıcanda meyve boyutları ağırlık ve uzunluk açısından oldukça farklılık göstermektedir (1). İlk patlıcan bitkisi uzun boylu, dikenli yapraklı, tadı acımsı meyveleri küçük ve rengi yeşil iken kültüre alınma, mutasyon, seleksiyon çalışmaları ile ve melezlenmeler ile bugünkü halini almıştır (14). Patlıcandaki farklılıklar genel olarak meyve rengi, biçimi ve ağırlığında daha fazla görülmektedir. Uygun koşullarda bir bitkiden ortalama 10 - 30 meyve elde edilebilmektedir. Patlıcanın meyve boyutları yuvarlaktan uzun bir gözyaşı damlasına kadar değişen uzun - silindirik bir yapıya sahiptir. Patlıcanda 2 farklı renk pigmenti (klorofil a ve klorofil b) ve antosiyaninler farklı kombinasyonlarda ve oranlarda bulunarak meyve rengini kontrol etmektedirler (25). Patlıcanda meyve renk aralığı; parlak siyahtan açık-koyu mor, yeşil, beyaza kadar değişmektedir. Meyve boyu 4 - 45 cm; kalınlığı 2 - 35 cm; ağırlığı 15 - 1500 gram arasında değişmektedir. Meyveler tekli veya salkım halinde bulunurlar. Patlıcanın tadındaki acılık farklı miktardaki kimyasallardan gelmektedir. Türkiye’de patlıcanın yuvarlak, yarı uzun ve uzun olarak yetiştirilen birçok çeşidi vardır.

Meyve boyutu çiftçiler ve tüketiciler açısından oldukça önemlidir. Patlıcanın meyve boyutu birincil ve ikincil yetiştirme merkezlerinin çevresinde özellikle Asya’da çeşitlilik göstermektedir. Güney ve Güneydoğu Asya’daki *S. melongena* çeşitleri genellikle küçük meyvelere sahiptirler; fakat *Solanum insanum*’ dan daha büyük meyveye sahiptirler. Bazı çalışmalar ‘bebek’ patlıcan meyvesinin pazarda sıklıkla tercih edildiğini belirtmişlerdir (27).

Genellikle tek yıllık olarak yetiştirilen, tüylü ve dikenli olan patlıcanın kökleri dik şekildedir. Kök uzunluğu 30 - 100 cm arasında değişmektedir. Patlıcan kazık köke sahiptir. Yaprakları 10 - 15 cm boyutlarındadır. Çiçekler 2 - 3 boğumda bir ya da her boğumda 2 - 3 tomurcuk şeklindedir. Korolla soluk mor renkli yaklaşık 3 cm çapa sahiptir. 5 - 8 adet arasında stamen bulunmaktadır. Stamenler genellikle sarı renktedir (28, 29).

2.3. PATLICANIN EKOLOJİK İSTEKLERİ

Patlıcan ülkemizde açık alanda - serada; yaz, kış, bahar aylarında yetiştirilen bir sebze türüdür. Patlıcan, ılık iklimlerde tek yıllık olarak yetişirken; tropik iklimlerde ise çok yıllık - ağaç şeklinde yetişmektedir. Patlıcan sıcaklığı seven bir bitkidir. Büyüme dönemindeki 22 °C - 30 °C arası sıcaklık yüksek verim ve kaliteli meyve üretebilmek için gereklidir. Patlıcan yetiştiriciliğinde gece sıcaklığının en az 16 °C olması istenmektedir. Patlıcan büyüme döneminde karşılaştığı soğuk havadan olumsuz etkilenmektedir; bitki büyümesi ve verimi düşmektedir. Tek yıllık - iki yıllık yetiştirilebilen patlıcanda döllenme kendi kendine olabildiği gibi yabancı döllenme de olabilmektedir (25). Patlıcan, pH' ı 6 - 7 arasında olan, organik madde bakımından zengin, tınlı - kumlu, geçirgen ve derin topraklarda daha iyi gelişim göstermektedir. Patlıcanın yetiştiği topraktaki nem oranının %60 - 70 arasında olması oldukça önemlidir.

Patlıcan vejetasyon süresi uzun bir bitkidir. Vejetasyon süresinin uzun olması, patlıcanda yetiştiriciliğin tohum yerine fide ile yapılma sebebidir. Tohumlar aralık - ocak ayı gibi ekilirken fideler mart - nisan ayında dikilmektedir. Çift sıralı yapılan yetiştiricilikte sıra arası genişliğe göre 50 - 60 cm veya 90 - 110 cm olmalıdır. Dekarda ortalama 2000 - 3000 bitki bulunmaktadır.

Patlıcanın bakımında iki çapalama yapılır. Bunlardan ilki dikimden 1 hafta sonra; ikincisi ise dikimden 1 ay sonra gerçekleştirilir. Sulamada tercih edilen yöntem ise damla sulamadır. Patlıcanda ilk meyve görülünceye kadar sulama yapılmaz. Budama ise ilk ürün alındıktan sonra ürün miktarı azaldığında yapılır. Patlıcan hasatı meyveler uygun iriliğe ve renge ulaştığında gerçekleştirilir. Meyve hasatında makas veya bıçak kullanılır; meyve sapı meyvede kalacak şekilde hasat yapılır. Patlıcanda bir bitkiden ortalama 10 - 30 arasında meyve alınmaktadır. Bir dekardan ortalama 2 - 13 ton meyve alınabilmektedir (29, 30).

2.4. PATLICANIN BESİN DEĞERİ VE SAĞLIK AÇISINDAN ÖNEMİ

Bitki ile beslenmedeki önemli noktalardan birisi de şeker, yağ, protein, lifler gibi makro besinler ve bunların kalori değerleridir. Çünkü makro besinler yaşam için gereklidir ve bir bitkinin sağlık açısından etkinliğini, gıda kalitesini belirlemede kullanılabilir. Sekonder metabolitler ise ikincil olarak gelmektedir ve sağlıkla ilişkilidir.

Patlıcan sağlık açısından olan etkileri ile kullanımını arttırmaktadır (31). Dünya genelinde patlıcan ve yakın akraba türlerinin kullanımı oldukça yaygındır. Sadece Asya'da patlıcanın 77 tıbbi uygulaması bildirilmiştir (32). Patlıcan hem primer hem sekonder hem de mineral içerikleri bakımından fonksiyonel gıda olarak tanımlanmaktadır (33). Çin'de ve Hindistan'da patlıcanın besin değerini gösteren eski yıllarda yazılmış kayıtlar bulunmaktadır (34). Bu kayıtlar patlıcanın kültüre alınma sürecinin önemli bir parçası olmuştur.

Güney ve Güneydoğu Asya'daki *S. melongena* çeşitleri *S. insanum* ve birçok Asya türünden daha fazla miktarda hidroksisinamik asit ve 5-Z-kafeoilkinikasit (klorojenik asit, antioksidan) içermektedir (35). Erken gelişim aşamasındaki meyveler daha sonraki gelişim evresindeki meyvelere göre daha yüksek seviyelerde klorojenik asit ve antioksidan bileşikler içermektedir (27).

Patlıcan meyve kabuğunda klorojenik asit gibi fenolik bileşiklere sahipken; ayrıca antosiyaninde içermektedir (36). Fenolik asit ve antosiyaninlerin insan sağlığı için faydalı olduğu; birçok hastalığa karşı koruyucu özellik gösterdiği ve yaşlanmayla ilişkili süreçleri yavaşlatmada etkili olduğu bildirilmektedir (37). Ayrıca antosiyaninlerin raf ömrünü uzatıcı etkiye sahip olduğu da bilinmektedir. Patlıcanın yaprak özütlerinin astım, bronşit, kolera gibi hastalıkların tedavisinde kullanıldığı, patlıcanın meyvesinin ise kandaki kolesterolü azaltmada yardımcı olduğu bildirilmektedir (26). Patlıcan çok düşük kalorili bir sebzedir. Yüksek düzeyde vitamin, mineral ve biyoaktif bileşikler içerir. Ayrıca insan sağlığı için oldukça faydalı olan; mide kanserini önleyebilen biyoflavonoidler içerir. Patlıcanın içerdiği atropin, nikotin, ve kapsaisin alkaloid türevlerinin sinir sistemi ve epitel doku üzerine etkileri olduğu, bazı insanlar üzerinde alerjik reaksiyon gibi olumsuz etkileri olabileceği belirtilmektedir (37). Patlıcanda bulunan potasyum ve magnezyum da insan sağlığı için faydalı minerallerdendir. Doğu Afrika'da patlıcan; göğüs ağrısı, diş ağrısı, ateş, karın ağrısı gibi hastalıklarda kullanılmaktadır. İyi bir vitamin ve mineral kaynağı olan

patlıcan besleyici içeriği açısından domatese yakın özellikler göstermektedir (38). Ülkemizde patlıcanın lapa halindeki meyveleri romatizma tedavisi için halk arasında kullanılmaktadır (39).

Çince de ‘Qiegen’ olarak adlandırılan *S. melongena*’nın kökleri; Çin’de mayasıl, beriberi, kaşıntı, diş ağrısı, kanama gibi hastalıkların geleneksel tedavisinde kullanılmaktadır (29). Patlıcan Hintliler tarafından da sıklıkla kullanılmış; enflamasyon, kolera, bronşit, astım gibi hastalıkların tedavisinde patlıcandan yararlanılmıştır (40).

Ayrıca, *Solanum melongena*’nın aneljezik, antiastimatik, antidiyabetik, antienflamatuvar, antihipertansif, antimutajenik, antioksidan ve hipokolesterolemik etkileri, yine görme üzerine etkisi üzerine araştırmalar mevcuttur (29).

2.5. DÜNYADA VE TÜRKİYE’DE PATLICAN YETİŞTİRİCİLİĞİNİN DURUMU

Patlıcan, Asya ve Akdeniz havzasında oldukça popüler bir sebze türüdür. Patlıcan; patates, domates ve biberle birlikte Solanaceae familyasına ait 1.858.253 ha üretim alanı ile en önemli 4. sebze türüdür (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Solanaceae familyasına ait önemli sebzelerin ekilen alan miktarları (FAO, 2017).

Patates	19.302.642 (ha)
Domates	4.848.384 (ha)
Patlıcan	1.858.253 (ha)
Biber	568.29 (ha)

2020 yılı verilerine göre dünyada patlıcan üretimi 1.876 milyon hektar alanda 56.6 milyon ton olarak gerçekleştirilmiştir. Patlıcan üretiminin dünyada bölgeler arasındaki dağılımına bakıldığında 53.2 milyon ton ile Asya ilk sırada yer almaktadır. Dünyadaki bölgeler arasında en az patlıcan üretimine sahip olan ise 4 bin ton ile Okyanusya’dır.

Dünyadaki patlıcan üretim alanlarının ve üretim miktarlarının bölgeler arasındaki dağılımı Çizelge 2.2.’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Dünyadaki patlıcan üretim alanlarının ve üretim miktarlarının bölgeler arasındaki dağılımı (2020).

Bölgeler	Üretim Alanı (ha)	Üretim Miktarı (ton)
Asya	1718.049	53.234.437
Afrika	117.882	2087.592
Avrupa	28.285	960.227
Amerika	12.287	332.241
Okyanusya	207	4346

<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>

Son 3 yıl ortalamasıyla Dünyada patlıcan üretimine ülkeler itibarı ile bakıldığında patlıcan üretiminde ilk sırada Çin bulunmaktadır. Üretimde en fazla yer alan ülkeler sırasıyla: Çin, Hindistan, Mısır ve Türkiye'dir. Dünya genelindeki önemli patlıcan üreticisi ülkelerin 2018, 2019 ve 2020 yıllarına ait patlıcan üretim alanları ve üretim miktarları Çizelge 2.3.'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Önemli patlıcan üreticisi ülkelerin yıllara göre üretim alanları ve üretim miktarları.

Ülkeler	Yıllar	Ekim Alanı (ha)	Üretim (ton)
Çin	2018	782.214	34.517.745
	2019	784.301	35.625.842
	2020	790.658	36.593.224
Mısır	2018	43.757	1179.173
	2019	49.897	1347.230
	2020	49.512	1341.312
Hindistan	2018	730.000	12.801.000
	2019	727.000	12.680.000
	2020	736.000	12.777.000
Endonezya	2018	44.524	551.529
	2019	43.954	575.392
	2020	47.063	618.202
İran	2018	19.562	605.597
	2019	19.001	594.136
	2020	19.184	595.336
İtalya	2018	9560	298.310
	2019	9550	300.620
	2020	9510	304.690
Japonya	2018	8970	300.400
	2019	8650	301.700
	2020	8420	297.000
Türkiye	2018	23.860	836.284
	2019	23.244	822.659
	2020	23.379	835.422

<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>

Çizelge 2.3.'te görüldüğü gibi Türkiye patlıcan üretiminde önemli bir ülkedir. Türkiye, Dünya patlıcan üreticisi ülkeler arasında en yüksek üretim miktarına sahip 4. ülkedir.

Türkiye’de patlıcan üretimi yıllara göre değişkenlik göstermektedir (Çizelge 2.4.) (41). Türkiye’de patlıcan yetiştiriciliğinin en fazla yapıldığı bölge Antalya civarlarıdır. Yetiştirilen patlıcanın farklı morfolojik özellikleri mevcuttur. Patlıcanın meyve tiplerine göre sofradaki kullanım alanları değişmektedir. Patlıcana olan talebin fazla olmasından dolayı; Türkiye, Asya ve Ortadoğu’da yetiştiriciler birçok patlıcan türünü yetiştirmektedir. Patlıcan açık alanda veya örtü altında yetiştirilebilir. FAO (2020)’ya göre, Türkiye’de 23.000 ha alanda her yıl yaklaşık 830.000 ton patlıcan üretilmektedir (42).

Çizelge 2.4. Türkiye’de yıllara göre patlıcan üretim miktarı (41).

Yıl	Üretim Miktarı (ton)
2005	930000
2007	863000
2009	816134
2011	821770
2013	826941
2015	805259
2016	854049
2017	883917
2018	836284
2019	822659
2020	835422
2021	832938

Türkiye patlıcan üretiminde Avrupa ülkeleri arasında en büyük paya sahip ülkedir. Patlıcan yetiştiriciliği ülkemizde en yoğun olarak Akdeniz Bölgesinde yapılmaktadır. Üretimin yoğunlaştığı diğer bölgeler Ege ve Güneydoğu Anadolu’dur. Ülkemizde patlıcan üretimin yaklaşık %50’si Antalya ve Mersin’de gerçekleşmektedir. Bunun sebebi bu illerin iklim özelliklerinden dolayı kış aylarında örtü altında patlıcan yetiştiriciliğine uygun olmalarıdır. Türkiye’ de bazı illerdeki patlıcan üretim alanları ve üretim miktarları Çizelge 2.5.’de verilmiştir.

Çizelge 2.5. Türkiye’de bazı illerdeki patlıcan üretim alanları ve üretim miktarları (2021 yılı).

İller	Üretim Alanı (1000 ton)	Üretim Miktarı (1000 dekar)
Adana	7838	43270
Ankara	1142	2507
Antalya	22499	246993
Aydın	4213	20772
Balıkesir	4900	25507
Bursa	8503	28036
Diyarbakır	8086	23990
Gaziantep	11660	33128
Hatay	7386	19412
İzmir	4554	14954
Karaman	4548	15161
Manisa	6143	14803
Mersin	16716	152491
Muğla	5158	35120
Samsun	6337	19202
Şanlıurfa	5672	25573
Tokat	3583	11535
Van	794	1518

<https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>

2.6. PATLICANDA BİYOTİK STRES

Patlıcan, uzun bir büyüme dönemine sahiptir ve çeşitli bitki hastalıklarına, nematodlara, yabancı otlara diğer sebzelerden daha fazla maruz kalmaktadır (43). Patlıcan; yaprak bitleri, yaprak zararlıları, trips gibi böcek zararlılarıyla baskı altındadır. Patlıcan ayrıca çok sayıda hastalığa da duyarlıdır. Bunlar; bakteriyel solgunluk, Verticillium solgunluğu, Fusarium solgunluğu, antraknoz, meyve çürüğü, yaprak lekesi gibi hastalıklardır (44). Zararlılara ve hastalıklara karşı direnç diğer türlerde olduğu gibi patlıcanda da oldukça önemlidir. Patlıcanda hastalığa sebep olan etmenler ve sebep oldukları hastalıklardan bazıları Çizelge 2.6.’da verilmiştir (45).

Çizelge 2.6. Patlıcanda hastalığa sebep olan etmenler ve sebep oldukları hastalıklardan bazıları.

Hastalığın Adı	Hastalığa sebep olan etmen
<i>Leveillula taurica</i>	Patlıcangillerde Külleme Hastalığı
<i>Fusarium spp.</i>	Fusarium Solgunluğu
<i>Verticillium dahliae</i>	Verticillium Solgunluğu
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Bakteriyel Solgunluk
<i>Meloidogyne javanica</i>	Kök-ur Nematodu
<i>Phytophthora infestans</i>	Domates Mildiyö Hastalığı
<i>Tospovirus</i>	Domates Lekeli Solgunluk Virüsü
<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Sera beyazsineği

Tropik ve subtropik bölgelerde patlıcan meyve ve sürgün kurdu, *Leucinodes orbonalis*, %65'e varan verim kaybına neden olan önemli bir patlıcan zararlısıdır. Bu böceğin larvaları patlıcan sürgünlerinde delik açarak bitkinin solmasına ve meyve verememesine neden olmaktadır. Ayrıca larvalar meyvelerde de delikler oluşturarak meyvelerin pazarlanamaz hale gelmesine neden olmaktadır. Zararlı, bitki gövdesinde ortaya çıktığından böcek öldürücü ilaçlardan etkilenmemektedir. Böcek ilaçlarından etkilenmemesi ve bitkilerin bu zararlıya karşı duyarlı olması *Leucinodes orbonalis*'i başlıca patlıcan zararlılarından yapmaktadır.

Bu zararlının dışında patlıcan meyve kurdu *Helicoverpa armigera*, sap kurdu *Euzophera perticella*, *Epilachna vigintipunctata*, yaprak bitleri ve nematodlar (*Meloidogyne spp.*) da patlıcan yetiştiriciliğinde verimi etkileyen önemli zararlılardır.

Toprak patojenleri, özellikle toprak nem içeriği yüksek olduğunda patlıcan yetiştiriciliğini olumsuz etkilemektedir. *Fusarium*, *Verticillium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium* ve *Phytophthora* gibi birçok fungal etmenin neden olduğu solgunluk, patlıcanda önemli verim kaybına neden olmaktadır. Solgunluk yaprakların sararmasından bitkilerin ölümüne kadar geçen süre ile karakterize edilir.

Pythium spp., *Phytophthora parasitica*, *Rhizoctonia solani* ve *Sclerotium rolfsii* fidelerde ani solgunluklara neden olmaktadır. Ayrıca *Pseudomonas solanacearum*'un neden olduğu bakteriyel solgunluk da ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Yaprak biti ile bulaşan viral hastalık (Patates Y virüsü) yapraklarda mozaik şeklinde lekelere ve bitkilerde bodurlaşmaya neden olmaktadır. Bitkiler deforme olmuş yapraklar ve bodur büyüme gösterirler. Patlıcanı etkileyen diğer virüsler arasında Salatalık mozaik virüsü, Potyvirus, Yonca mozaik virüsü bulunmaktadır.

Patlıcanda mikoplazma küçük yaprak hastalığına neden olmaktadır ve böceklerin özsuyu ile bitkiye bulaşmaktadır. Enfekte olan bitkinin genç yapraklarında kloroz görülür, bitkinin yapraklarında ve boğumları gibi toprak üstü kısımlarında belirgin bir azalma görülür. Enfekte bitkiler ciddi şekilde bodurlaşır. Hastalıklı bitkiler neredeyse hiç pazarlanabilir meyve veremez hatta belirli durumlarda %90'a varan verim kayıpları meydana gelmektedir (46).

2.7. PATLICANDA ABİYOTİK STRES

Patlıcanın en iyi şekilde büyümesi ve kaliteli meyveler vermesi için iklim koşulları son derece önemlidir. İklim koşullarındaki aşırı değişkenlik, patlıcanı hem üretim hem kalite açısından olumsuz etkilemektedir.

Patlıcanda ürün verimini ve kalitesini etkileyen abiyotik stres faktörleri:

- Kuraklık,
- Tuzluluk,
- Düşük ve yüksek sıcaklıklardır.

Patlıcanın büyümesi ve gelişmesi için en uygun sıcaklık 22 °C – 30 °C arasında değişmektedir. Patlıcan soğuğa karşı çok hassastır. Kış aylarında meydana gelen düşük sıcaklık kök büyümesini sınırlar; bitkiyi zayıflatır ve meyvelere hasar verir. Optimum sıcaklık sınırının üzerindeki sıcaklıklar bitki büyümesini sınırlandırır, çiçek dökümünü artırır, verimi azaltarak meyve kalitesini düşürür.

Kuraklık; bitkide fotosentez hızını azaltır, bitki büyümesini yavaşlatır. Geçici kuraklığın birçok ürüne sürekli kuraklık kadar zarar verebileceği bildirilmiştir. Kuraklık geçici olsa bile; koşullar eski haline getirildiğinde fotosentez kapasitesindeki olumsuz etkinin devam ettiği bildirilmiştir. Tarla düzeyinde geçici kuraklık dönemleri su akışının azalması, yeraltı suyu seviyesinin düşmesi gibi sulama suyu sıkıntısı nedeniyle meydana gelebilir.

Kuraklık ve sıcağa aynı anda maruz kalma (özellikle tarla koşullarında yaygın) meyvelerin kalitesini ve pazarlanabilirliğini önemli ölçüde azaltır.

Sıcaklık ve kuraklık stresi patlıcanda hızla yayılan fungal hastalıkların gelişimini de tetiklemektedir.

Patlıcan su baskınlarına (asfiksi) dayanıklı değildir. Su birikintisine maruz kalmak yapraklarının - çiçeklerinin dökülmesine neden olur. Ayrıca solma ve çürüme ile ilişkili patojenlerin çoğalmasına yol açar (46).

Erken dönemde tuzluluk stresine maruz kalmanın patlıcanda meyve verimini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (47).

2.8. PATLICANDA AŞILAMA

Aşılama, bitkinin anaç, kalem gibi kısımlarının uygun tekniklerle uygun koşullarda birleştirilerek tek bir bitki gibi büyütülmesini sağlayan bir tekniktir. Aşılama bitkinin üst kısmı 'kalem' olarak adlandırılırken; altta kalan kısmına 'anaç' adı verilmektedir (48).

Aşılama ilk olarak sebzecilikte 1920'li yıllarda kullanılmıştır. Sebze ilk aşılama Fusarium solgunluğuna karşı yapılmış, anaç olarak su kabağı kullanılarak karpuzun Fusarium solgunluğuna dayanımı amaçlanmıştır (49). Aşılama İtalya, Fransa, İspanya, Hollanda, Japonya gibi ülkelerde oldukça yaygındır (48, 50).

Aşılama genellikle meyvecilikte yapılan bir uygulamadır. Meyvecilikte eşeysiz çoğalamayan türlerin çoğaltılması, virüsten arı üretim, çeşit geliştirme gibi amaçlarla aşılama yararlanılmaktadır (48).

Meyvecilikte yaygın olmasına rağmen aşılama sebzecilikte de uygulanmaktadır. Sebzelerde, toprak kökenli hastalıklarla mücadele, olumsuz hava - toprak koşullarına karşı dayanıklılık sağlama, hastalık zararlılara dayanıklı ürün elde etme, ilaç kullanımını azaltma, ürün verimini artırma gibi amaçlarla aşılama sıklıkla yararlanılmaktadır (48).

Patlıcanda aşılamanın esas amacı toprak kökenli hastalıklara karşı dayanım sağlamaktır. Patlıcana en çok zarar veren biyotik faktörler: Verticillium, Fusarium, bakteriyel solgunluk, nematodlar ve kök çürüklüğüdür (51, 52). Yapılan çalışmalarda patlıcanda anaç olarak *Solanum torvum* kullanıldığında biyotik etmenlere dayanıklılığın sağlandığını belirtilmiştir (53). Başka bir çalışmada araştırmacılar *S. aethiopicum* L.'un anaç olarak kullanıldığında Verticillium solgunluğundan kaynaklanan zararlanmanın azaldığını belirtmişlerdir (54).

Solanum torvum'un biyotik ve abiyotik stres koşullarına karşı gösterdiği dayanıklılıkla en önemli patlıcan anacı olduğu belirtilmiş; fakat tohum çimlenmesinde yaşanan sorundan dolayı farklı anaçların yetiştirilmesi gerektiği belirtilmiştir (55).

Sebzede aşılamanın avantajları dışında kullanımını sınırlandıran bazı dezavantajları da vardır. Bunlar: fazla maliyetli olması, aşılama için ekstra zamana ve tecrübeye ihtiyaç duyulması, aşılama sonrası uyumsuzlukların olması bununla beraber gelen aşılama başarısızlık, kullanılan anacın hibrit olduğu durumlarda zaman - maliyet artışı olmasıdır (48).

2.9. PATLICANDA TÜRLER ARASI MELEZLEME

Patlıcan yetiştiriciliğinde verim ve kaliteyi etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Kültür patlıcanı (*Solanum melongena*) Fusarium - Verticillium solgunlukları, kök - ur nematodu, bazı bakteriyel hastalıklar ve birçok böceğe karşı oldukça hassastır. Patlıcana zarar veren biyotik etmenlerden özellikle toprak kaynaklı olan etmenler ciddi verim kayıplarına neden olmaktadır. Kültür patlıcanının duyarlı olduğu bu zararlılara yabancı patlıcan türleri oldukça dayanıklıdır. Yabancı patlıcanda bulunan dayanıklılığın kültür patlıcanına aktarılması için türler arası melezlemeler yapılmaktadır (56, 57).

Hastalık ve zararlılarla mücadelede uygulanan yöntemlerden olan türler arası melezlemede başarılı - verimli hibrit bitkiler elde edilebildiği gibi; kısırılık, meyve tutumunun gerçekleşmemesi gibi durumlar da meydana gelmektedir (56). Melezlemelerdeki başarı oranı, türler arasındaki akrabalık düzeyine - genetik yakınlığa bağlı olarak değişmektedir.

Yapılan melezleme çalışmalarına bakıldığında *Solanum melongena*'nın, *S. macrocarpon*, *S. incanum*, *S. aethiopicum* ile melezlenmesi sonucu başarı sağlandığı belirtilmiştir. Bunun dışında, *S. sisymbirifolium* ile melezlemede başarı sağlanamamış, *S. torvum* ile melezleme sonucunda ise kısır bitkiler elde edilmiş; *S. torvum* bitkisi oldukça zor çimlenmiştir (58).

Patlıcanda türler arası melezlemelerde eşeysel uyumsuzluklar en büyük sorunlardan birisini oluşturmaktadır. Bu uyumsuzlukları gidermek için farklı doku kültürü tekniklerinden yararlanılmaktadır. Bu teknikler; haploidizasyon, somatik hibridizasyon, protoplast kültürü ve genetik transformasyondur (59). Klasik ıslah çalışmalarına alternatif olarak, patlıcanın yabancı türleri ile kültür patlıcanı arasındaki eşeysel uyumsuzlukları aşmak için mezofil protoplastlarıyla elektrofüzyon araştırmaları gerçekleştirilmiştir. Ancak araştırma

sonucunda *Fusarium* solgunluğuna dayanıklı melezleri seçmek için kullanılan geleneksel tarama yöntemleri ile fazla miktarda ıslah materyalinin taranmasının hem zaman alıcı hem de yoğun işgücü gerektirdiği belirtilmiştir (60).

S. melongena ve *S. aethiopicum* arasında *Fusarium* solgunluğuna dayanıklılık integrasyonunu araştırmak amacıyla somatik melezlemeler yapılmış, anter kültürü ile dihaploid bitkiler elde edilmiştir (61).

Ralstonia solanacearum ve *Verticillium* solgunluğuna dayanıklılığı *S. torvum*'dan *S. melongena*'ya aktarmak için protoplast kültürü yapılmıştır. Elde edilen somatik hibritlerin genom analizleri GISH (Genomic in situ hybridisation) ile yapılmıştır (62).

S. aethiopicum gr. *Gilo* ve *S. integrifolium*'un *Fusarium oxysporum*'a dayanıklılık sağladığı bilinmektedir. Yapılan çalışmada kültür patlıcanına (*S. melongena*) dayanıklılığı aktarmak için *S. melongena* X *S. aethiopicum* ve *S. melongena* X *S. integrifolium* arasında somatik melezlemeler gerçekleştirilmiş; yapılan türler arası melezlemeler sonucunda dayanıklılık ile ilişkili markırlar belirlenmiştir (60).

Patlıcanda *Verticillium* solgunluğuna dayanıklılık sağlamak amacıyla yapılan çalışmada *S. linneanum* ve *S. melongena* türleri arasında melezlemeler yapılmış, melezlemeler sonucunda dayanıklılığın kültür patlıcanına geçtiği görülmüştür (63).

S. aethiopicum ile kültür patlıcanının (*S. melongena*) somatik melezlenmesinin sonucunda elde edilen, '*rfo-sa1*' dayanıklılık lokusu taşıyan hatlara, *Fusarium* ve *Verticillium* etmenleri bulaştırılmış; hastalık şiddetine fenotip düzeyinde bakılırken *Fusarium* ve *Verticillium* solgunluklarına savunma yanıtı oluşturan aday genlerin ifadesi ise köklerde qRT-PZR, SSH, mikrodizin analizleri ile belirlenmiştir (64).

S. integrifolium ve *S. melongena* 'nın Dingaras Multiple Purple çeşidi ile melezlenmiş, elde edilen F1 melezlerinin de *Fusarium oxysporum*'a dayanıklılık gösterdiği belirtilmiştir (65).

Melez bitkilerin polenlerinin canlılıklarına bakılan bir çalışmada, *S. melongena* ana olarak kullanıldığında %10 - 15 olan polen canlılığı; *S. macrocarpon* ana olarak kullanıldığında %1 - 9 arasında bulunmuştur. Bu çalışmanın devamında F1 bitkilerinden F2 ve BC1 popülasyonu elde edilmiştir (66). *S. macrocarpon* ve *S. melongena* arasındaki diğer melezleme çalışmalarına bakıldığında; *S. macrocarpon*'un ana olarak kullanıldığđı bir çalışmada %52 oranında polen canlılığı tespit edilmiş, F1'lerden F2 - F3 popülasyonları

elde edilmiştir. *S. melongena* ana olarak kullanıldığında ise %49 oranında polen canlılığı belirlenmiş yine F2 - F3 popülasyonları elde edilmiştir (67). Bir diğer melezleme çalışmasında *S. macrocarpon* ana olarak kullanıldığında polen canlılığı %30 olarak belirlenmiş; F1'lerin kısmen kısır elde edilen F1 meyvelerinin ise partenokarpik olduğu; *S. melongena*'nın ana olarak kullanıldığında da benzer sonuçlar elde edildiği gözlemlenmiştir (68, 69).

2.10. *FUSARIUM OXYSPORUM*

Fusarium oxysporum fungal kökenli bir hastalıktır. Funguslar; klorofil içermeyen, spor oluşturabilen, eşeyli - eşeysiz çoğalabilen organizmalardır. Fungusların hücre zarında kitin ve selüloz bulunmaktadır (70). Fungal bir etmen olan *Fusarium oxysporum*; makrokonidi, mikrokonidi, klamidospore olmak üzere 3 farklı şekilde spor üretirler (71). *Fusarium oxysporum* etmeni toprakta bulunan lignin ve karbondhidratı parçalayarak yaşamını sürdürür. *Fusarium oxysporum*; oldukça fazla sayıda konukçuda etki gösterebilmektedir, bazı türleri patojendir. *Fusarium oxysporum*'ların konukçuya özelleşebilme özelliği olduğundan *Fusarium oxysporum* forma specialis (f.sp) olarak adlandırılmaktadır (72).

Fusarium 'un sınıflandırması aşağıdaki gibidir:

Alem: Fungi; Phylum Ascomycota

Sınıf: Sordariomycetes

Familiya: Nectriaceae

Cins: *Fusarium*

Fusarium oxysporum'un tüm suşları saprofitiktir ve topraktaki organik madde üzerinde ve birçok bitki türünde uzun süre canlı kalabilir hatta büyüyebilirler. Ayrıca bazı *F. oxysporum* türleri farklı bitki türleri için patojeniktir, köklere nüfuz ederek vasküler sistemi etkilerler. Bunun yanında diğer birçok suş köklere nüfuz edebilir ancak vasküler sistemi etkilemediği için hastalığa neden olmaz. *F. oxysporum*'un solgunluğa neden olan suşları, ekonomik açıdan önemli birçok bitki türünde ciddi hasarlara neden olmaktadır.

Fusarium solgunluk patojenleri yüksek düzeyde konukçu özgülüğü gösterirler. Bitki türüne ve çeşidine bağlı olarak 120'den fazla formae speciales ve ırka sahiptirler (73). Birçok *fusarium* türünün teleomorfik aşamaları bilinmediğinden *Fusarium* taksonomisinde

makrokonidilerin boyutu ve şekli, mikrokonidi ve klamidosporelerin varlığı veya yokluğu, koloni rengi ve konidiofor yapısı gibi morfolojik özellikler kullanılmaktadır (74).

1985 yılında vejetatif uyumluluklarına dayalı olarak *Fusarium oxysporum* suşlarının sınıflandırılması için bir sistem önerilmiş; bu sistem her suşun vejetatif uyumluluk grubunu (VCG) belirlemek için nitrat kullanılmayan mutantların eşleştirilmesine dayanan bir sistemdir (75). Bu yöntemle bazı formae specialis'ler tek bir VCG'ye denk gelirken bazıları birkaç VCG'ye denk gelmektedir. 1999 yılında yapılan bir çalışmada 38 formae specialis için 59 VCG tanımlanmıştır (76). VCG'nin patojenik olmayan fusarium ırklarını ayırmada başarılı olmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle VCG evrensel bir yöntem olarak kullanılamamaktadır.

Fusarium türlerini belirlemede klasik taksonomik karakterlerin eksikliği ortaya çıkınca araştırmacılar moleküler araçlara yönelmişlerdir. Translasyon uzama faktörü EF-1 α ve mitokondriyal küçük alt birim ribozomal RNA genlerinin dizisinin ayırmada değerli olduğu belirtilmiştir (77). UTP - amonyak ligaz, trikotesen 3-0-asetiltransferaz, nitrat redüktaz, fosfat permeazın da Fusarium türlerini ayırt etmede başarılı olduğu belirtilmiştir. β -tubulin bölgesinin dizileri bazı fusarium türlerini ayırt edebilirken bazılarını ayırt etmede başarısız olmuştur (78). ITS bölgelerinin DNA dizileri, birçok ökaryotik organizmada türleri ayırt etmede başarıyla Fusarium için bilgilendirici olmamıştır (79). Moleküler araçlar, patojenik suşları hatta bazı durumlarda patojenin ırklarını tanımlayabilmiş olsa da patojenitelerinin belirlenmesi için farklı çalışmalara ihtiyaç vardır.

'Formae specialis', fungusun çeşitli bitki türleri üzerinde patojenite açısından test edilmesiyle belirlenirken 'ırk' tek bir bitki türünün çeşitlerinde patojenite açısından test edilmesiyle belirlenir. Patojeniteyi belirlemek kolay olsa da bir suşun patojenik olup olmadığını belirlemek zordur. Çünkü 120'den fazla formae specialis ve ırk tanımlandığından tanımlanamayan suşları sonsuz sayıda bitki türü ve çeşidinde denemek gerekecektir. Bu da büyük bir toprak izolatu koleksiyonu gerektirmektedir (73).

F. oxysporum'un hastalık yapma süreci ışık, floresan, elektron mikroskobu kullanılarak incelenmiştir. Süreç birkaç adıma ayrılmıştır. Bunlar; kökü tanıma, kök yüzeyine bağlanma – kolonizasyon ve penetrasyonu, kök korteksinde kolonizasyon, solgunluk meydana geldiğinde ksilem damarlarının içindeki hüflerin proliferasyonudur (80).

F. oxysporum'da floresan protein etiketli ilk mikroskopik çalışma 2001 yılında *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*'de yapılmıştır (81). *F. oxysporum*'un patolojik olmayan izolatlarının biyokontrol mekanizmalarını anlamak için kök kolonizasyonu sırasında farklı floresan etiketli patojenik ve patojenik olmayan *F. oxysporum* suşları incelenmiştir (82-84). Yapılan çalışma sonucunda, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*'nin patojen ve patojen olmayan biyokontrol suşları incelenmiş ve topraktaki kolonizasyonlarının benzer olduğu görülmüştür. Bununla birlikte biyokontrol suşunun patojenik suştan daha hızlı büyüdüğü ve kökleri daha erken kolonize ettiği görülmüştür. Patojenik suşun kökler üzerindeki hücresel bağlantıları kullandığı belirtilmiştir (82, 85).

Fusarium oxysporum'un patojenezi için genetik yaklaşımlar kullanarak çeşitli süreçler ve genler belirlenmiştir. Sinyal iletimi de bu süreçler arasındadır; çünkü fungusların hastalık oluşturmak için bitki ortamına uygun şekilde yanıt vermesi ve salgılanan protein ve metabolitlerin morfolojisini, fizyolojisini ve spektrumunu ayarlaması gerekmektedir. Siklik adenosin monofosfat - protein kinaz A (cAMP-PKA), mitojen-aktif protein kinaz (MAPK) enzimleri bu süreçte yer alan enzimlerdendir. MAPK (FMK1) ve G-protein alt birimleri α (FGA1) ve β (FGB1)'nin tam patojenite için gerekli olduğu belirtilmiştir (86).

Çoğu fungus gibi *F. oxysporum*'da kök penetrasyonu ve kolonizasyonu sırasında poligalakturonaz, pektat liyaz, ksilanaz ve proteaz gibi hücre duvarını degrade eden enzimler salgılar (87). Fakat bu enzimlerin enfeksiyon sürecine katkıda bulunma derecesi henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Köke girişi esnasında *F. oxysporum*, fiziksel engeller ve antifungal bileşikler gibi çeşitli bitki savunma mekanizmalarına maruz kalmaktadır (87, 88). Buna bir örnek domates bitkisindeki antifungal bileşik olan α -tomatin'dir. α -tomatin fungusun zarlarında sterollerle kompleksler oluşturabilir ve porlar oluşturarak fungusun hücresel içeriğinin sızmasına neden olur (89, 90).

Patojenite için gerekli olan transkripsiyon faktörlerinin tanımlanması için yapılan çalışmalarda *F. oxysporum melonis*'teki FOW2, *F. oxysporum lycopersici*'deki Sge1'in patojenite için gerekli olduğu belirtilmiştir (80).

İlk *F. oxysporum* izolatının genom sekansı *F. oxysporum lycopersici*'de 2007'de yapılmıştır. Bu genom dizisiyle birlikte *Fusarium oxysporum*'da mutagenik, transkriptomik, proteomik gibi genomik yaklaşımlar hızlanmıştır (91).

2.11. *FUSARIUM OXYSPORUM MELONGENAE*

Fusarium oxysporum Schlecht. f. sp. *melongenae*, *Fomg* toprak kaynaklı patojendir ve patlıcanda seralarda ve açık alanda üretimi kısıtlayan vasküler solgunluk hastalığının nedenlerinden birisidir (37). *Fusarium oxysporum* hastalığı ilk olarak Matuo ve Ishigami tarafından 1958 yılında, Türkiye’de ise 2005 yılında Altınok ve ark. tarafından tespit edilmiştir (92). Hastalık etmeni olan fungusun üremesi sonucu oluşan sporlar, hastalığın yayılmasında önem taşımaktadır (70). *Fomg*, kısa mesafelerde sulama suyuyla ve bulaşık tarım aletleriyle yayılabilmektedir (37). Uzun mesafelerdeki yayılımı ise enfekte bitki ya da toprak taşınması ile gerçekleşmektedir. *Fusarium oxysporum* mikrokonidi, makrokonidi ve klamidospore olmak üzere 3 tip aseksüel spor üretmektedir. Mikrokonidiler tek hücreli fungusun bütün koşullarda ürettiği spor tipidir. Makrokonidiler ise 1 veya 2 hücreli spor tipidir. Klamidosporlar oldukça kalın hücre duvarına sahip olup, toprakta uzun süre yaşayabilmektedirler. Bu ise hastalıkla mücadeleyi zorlaştırmaktadır. *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* etmeni patlıcan köklerinden içeri girerek kökte besin ve su akışını sağlayan ksilemden besin absorbe etmekte ve etmenin ilerlemesi iletim demetleri içinde kökten gövdeye doğru olmaktadır. Bu ilerleme sonucunda iletim demetleri tıkanmakta, yapraklara su iletimi durmaktadır (70). Solgunluk alttan üst yapraklara doğru ilerledikçe ise bitki ölmektedir (93). Hastalığın karakteristik özelliği yaprak klorozu, dış yaprakçıkların sararması, daha sonra gövdenin vasküler renk değişikliği ve son olarak da bitkinin toprak üstü organlarının ölümüyle karakterize edilmektedir. Bu semptomlar aynı zamanda *Verticillium dahliae*’nin neden olduğu *Verticillium* solgunluğuna da benzerlik gösterdiği için teşhiste karışıklıklara neden olabilmekte, yanlış teşhis durumunda ise, *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* zararının patlıcanda tahmin edilenden fazla olmasına neden olabilmektedir (94). Her iki etmen benzer solgunluk belirtileri sergilerken iletim demetlerindeki belirtiler farklılık göstermektedir. Enfekte bitkiden enine kesit alındığında kahverengileşme floeme kadar ise *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* (*Fomg*), ksileme kadar ise *Verticillium dahliae* enfeksiyonunu karakterize etmektedir (95). *Fomg* 24 - 27 °C arası sıcaklıklarda ve yüksek nemli topraklarda daha hızlı bir şekilde hastalığa sebep olmaktadır (37). *Fomg* toprağın derinliklerine kadar yaşamlarını sürdürebilirler, yaşamlarına uygun pH 5 - 7 arasındadır (70). *Fusarium* solgunluğunun patlıcandaki zararlı etkileri Şekil 2.3.’de verilmiştir.



Şekil 2.3. *Fusarium* solgunluğundan etkilenen patlıcan bitkilerine ait genel bir görüntü (tez çalışması esnasında kullanılan bitkilerde).

Fomg ülkemizde olduğu gibi diğer ülkelerde de patlıcanda önemli kayıplara neden olmaktadır. *Fusarium* etmeninin varlığı, İtalya, Hollanda, ABD, İsrail, İspanya ve ülkemizde bildirilmiştir (96). *Fomg*'nin ülkemizde meydana getirdiği ürün kaybı yaklaşık %50 oranlarına ulaşmaktadır. Ülkemizde farklı coğrafik bölgelerden elde edilen *Fomg* izolatlarının ortalama %75'inin virülens olduğu bildirilmiştir (97). *Fusarium* solgunluğunun Mersin ve Adana illerinde dağılımı ile ilgili yapılan bir araştırmada, Mersin ilinde örtü altında ve tünellerde *Fusarium* hastalığının oranı %42.1 (şiddeti ise %18.5) iken açık alanda ise hastalık oranı %33.5 (şiddeti ise %15.1) olarak belirtilmiştir. Açıkta patlıcan yetiştiricilik oranının yüksek olduğu Adana ilinde ise açık alanlarda hastalığın görülme oranı %33.2 (şiddeti ise %16.4), izolatlarının gelişebildiği optimum sıcaklık 20 - 25 °C olarak bildirilmiştir (98). Açık alan patlıcan yetiştiriciliğine yönelik bir diğer çalışmada ise Antalya, Mersin, Hatay, İzmir, Manisa, Muğla, Aydın, Bursa, Samsun, Şanlıurfa ve Diyarbakır'da *Fusarium* hastalığının yaygınlığı ve şiddeti belirlenmiş, bu alanlardan elde edilen *Fomg* izolatlarının virülenslik seviyeleri araştırılmıştır. Çalışmanın sonucuna göre, en yüksek hastalık oranı %50 ile Hatay ve Bursa illerinde tespit edilmiştir. 381 *Fomg* izolatından 122'si yüksek düzeyde virülensli (%90 - 100), 175'i virülensli (%80 - 90), 62'si orta düzeyde (%0 - 79), 22 adedi ise düşük virülensli (%60 - 69) olarak bildirilmiştir (4). *Fusarium oxysporum*'un 70 adet izolatı Türkiye'deki patlıcan genotiplerinde test edilmiş, ayrıca 13 çeşit sera koşullarında da test edilmiştir. Sonuçlara göre, *Fusarium*'a dayanıklı olduğu bilinen LS1934 ve LS2436 hatları dışındaki Kemer ve Hadrian gibi yerel çeşitlerin çok hassaslık gösterdiği, 70 hastalık izolatının virülansının benzer olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlar ise ülkemizdeki *Fomg* izolatlarının genomik olarak çok varyasyon göstermediğini ortaya koymuştur. Çalışmada ayrıca Angela, Köksal, Yula, Nauma gibi çeşitler 3 virülans *Fomg* izolatına farklı derecelerde duyarlılık göstermiş

fakat; AGR-703 için hastalık şiddeti düşük bulunmuştur. AGR-703'ün *Fusarium solgunluğunun* görüldüğü topraklarda anaç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (99).

2.12. *FUSARIUM OXYSPORUM* F.SP. *MELONGENAE* DAYANIKLILIK KAYNAKLARI

Günümüzde patojenle mücadelede anaç olarak kullanılan genotiplerde dayanıklılık gözlenmekle birlikte yetiştiriciliği yapılan ticari patlıcan çeşitlerinde hastalığa dayanıklılık bildirilmemiştir (100). Dayanıklılık kaynakları genel olarak *Solanum melongena* dışındaki türlerde yer almaktadır. *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*'ya dayanıklılık *S. melongena* L., *S. indicum*, *S. aethiopicum* L. *acelatum* Group, *S. integrifolium*, *S. torvum*, *S. incanum*, *S. violaceum*, *S. sisymbriifolium*'da tanımlanmıştır. LS1934, LS174, LS2436 3 patlıcan çeşidinin *Fusarium*'a dayanıklı olduğu bildirilmiştir. *Fusarium solgunluğuna* hassas bitkiler arasında domates ve kavunda yer almaktadır. Domateste dayanıklılıkla ilişkili 4 gen bildirilmişken (*I*, *I1*, *I2*, *I3*); kavunda ise *Fom-1*, *Fom-2*, *Fom-3*, *Fom-4* genlerinin dayanıklılıkla ilgili olduğu bildirilmiştir (37). *Solanum melongena* kökeni; dolaylı olarak Hindistan ve Güneydoğu Çin'de yetiştirilen yabani *S. incanum*'dan ; *S. aethiopicum* ve *S. macrocarpon* 'un kökeni; Afrika'daki yabani akrabaları olan *S. anguivi* ve *S. dosyphyllum*'dan gelmektedir (14). *Solanum melongena*'ya taksonomik olarak en yakın olan *Solanum aethiopicum* gr. *Gilo* ve *Solanum integrifolium*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* etmenine dayanıklı türlerdir. *Solanum torvum* ise kendi kendine döllen, çoğunlukla Güneydoğu Asya, Batı Hindistan' da yetiştirilen bir patlıcan türüdür. *S. torvum*; bakteriyel - fungal solgunluğa, nematodlara yüksek oranda dayanıklılık sağlamaktadır. *S. torvum* solgunluk (*Fusarium* vb.) hastalıklarını kontrolde anaç olarak kullanılmaktadır (101). *Solanum melongena*' nın yabani atası olarak bilinen *Solanum incanum*, özellikle Afrika'nın kuzeyinde ve Pakistan'ın orta doğusunda yayılmıştır. *Solanum incanum*, *Fusarium oxysporum* gibi fungal hastalıkların yanında kuraklık gibi abiyotik streslere de dayanıklıdır. Yaygın yetiştiriciliği yapılan patlıcanlardan olan *Solanum aethiopicum* ağırlıklı olarak Afrika ve Brezilya'da bulunmaktadır. *S. aethiopicum*, fungal hastalıklara, kök - ur nematodlarına karşı dirençli olduğundan *S. melongena* ıslahında gen kaynağı olarak önemlidir. *S. aethiopicum* X *S. melongena* arasında yapılan somatik melezlemelerden elde edilen somatik hibritlerin *Fusarium solgunluğuna* dayanıklı olduğu; dayanıklılığın dominant tek gen tarafından kontrol edildiği bildirilmiştir (70). Patlıcanda *Fusarium solgunluğu* ile ilgili 1979 yılında yapılan bir çalışmayla *S. incanum*'un *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*'ya dayanıklı olduğunu bildirmişlerdir

(102). Japonya’da *S. integrifolium* ve *S. melongena* cv. Dingaras Multiple Purplex arasında yapılan melezleme sonucunda türler arası F1 hibritinin *Fusarium*’a *S. integrifolium*’dan daha iyi dayanıklılık gösterdiği bildirilmiştir (70). 1988 yılında yapılan bir çalışmada test edilen Dnestrovets X Stoikii 740, Dnestrovets X Erevanskii 3, Stoikii 740 X Poludlinny ve Erevanskii X Violetta hibritlerinin *Fusarium*’a dayanıklı olduğunu bildirmişlerdir (103). *S. melongena* X *S. integrifolium* meleziyle elde edilen Tabiyo VF anacının köklerinde bulunan ‘solavetivone’ içeriği; diğer patlıcanlara göre 5 kat fazla çıkmıştır. Bu maddenin *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongena*’ya dayanımda önemli olduğu belirtilmiştir (70). Gana’ da yapılan başka bir çalışmayla *S. aethiopicum*, *S. integrifolium*, *S. macrocarpon*, *S. anguivi* yabancı türlerinin *Fusarium*’a dayanıklı oldukları bildirilmiştir (104).

2.13. *FUSARIUM OXYSPORUM* İLE MÜCADELE

Toprak kaynaklı bitki patojenleri ile mücadele patojenin toprakta uzun süre kalıcı olmasından dolayı oldukça zordur. *Fusarium oxysporum* ile mücadelede farklı yöntemler uygulanmaktadır. *Fomg* ile mücadele kimyasal ve fiziksel mücadele başlıkları altında toplanmaktadır. Bir diğer mücadele yöntemi ise biyolojik kontroldür. Kimyasal mücadelelerin başında bitkiye uygulanan fungusit; toprağa uygulanan fumigantlar gelmektedir. Toprağa uygulanan fumigantların başında *Fusarium oxysporum* ile mücadelede kimyasal bir yöntem olan metil bromür (MtBr) oldukça etkilidir (3). Toprakta etkili bir fumigant olan metil bromür (MtBr) sıklıkla kullanılmış olmakla birlikte metil bromürün ekonomik olmaması ve topraktaki biyolojik aktiviteyi olumsuz etkilemesi, insan sağlığına zararlı olması, maliyetli olması kullanımını oldukça sınırlandırmıştır. MtBr uygulaması ozon tabakasında hasara yol açmakla birlikte toprakta kalıntı bırakmaktadır. Bu kalıntılar sebzelerde ve bitkilerde toksik etki yaratmaktadır. MtBr ayrıca topraktaki mikroorganizmaları da olumsuz etkilemektedir. Montreal Protokolü gereği MtBr’ in 2015 yılında dünyada tamamen yasaklanmış, ülkemizde ise 2000 yılında başlayan ve Dünya Bankası tarafından desteklenen ‘-MtBr’ e alternatif geliştirme-’ projesi ile 2008 yılında kaldırıldığı bildirilmektedir. MtBr’nin kullanımının yasaklanmasıyla birlikte metil bromür yerine alternatif uygulamalar kullanılmaya başlanmıştır. Toprak solarizasyonu, Dazomet (Basamid), Metam Sodyum metil bromüre alternatif olarak uygulanmaktadır. Basamid, toprak kökenli zararlılarda etkili bir uygulamadır ve diğer kimyasallara göre daha güvenilir ve ekonomiktir. Metil bromür yerine alternatif olarak kullanılan, toprak sıcaklığını solar enerji ile arttırarak sterilizasyon sağlayan; hidrotermal bir yöntem olan solarizasyon da önerilmiştir. Fakat solarizasyonun tek başına etkili olamadığı, sürekli kullanımının toprak

kökenli patojenleri azaltmaya yeterli olmadığı görülmüştür. Kültürel, biyolojik, kimyasal yöntemlerin kombine olarak kullanılmasının daha etkili olabileceği belirtilmiştir (97). Bunun yerine Basamid - solarizasyon uygulaması metil bromür yerine yapılmakta, etkili sonuç vermektedir. Hem metam sodyum hem basamid ile ilgili fusarium solgunluğunu azalttıklarına dair birçok çalışma mevcuttur; fakat bu yöntemler etkili olsa da çevreye ve topraktaki canlılara verdikleri zarar oldukça fazladır (70).

F. oxysporum ile mücadelede bitki özütlerinden de yararlanılmaktadır. ‘Ursolic asit’, ‘aseton’ bitki özütleriyle ilgili yapılan çalışmalarda bu özütlerin *F. oxysporum*’un etkisini azalttığı belirtilmiştir (105, 106). Bitki esansiyel yağları da fungusit olarak kullanılmakta; yeşil pestisit olarak adlandırılmaktadırlar.

Toprak kökenli *F. oxysporum* ile bir diğer mücadele yöntemi ise biyolojik kontroldür. Biyolojik mücadelede *F. oxysporum* ile etkileşime girerek onun etkinliğini azaltan mikroorganizmalar kullanılmaktadır (97). Biyolojik kontrol için yapılan çalışmalara bakıldığında, fungal hücre duvarı parçalayıcı kitinaz ve β 1-3 glukonaz enzim içeren *T. harzianum* ve *T. viride* türlerinin topraktaki *Fusarium solani* patojenini azalttığını belirtmişlerdir (107). Başka bir çalışmada *Bacillus* ve *Pseudomonas* bitki büyüme düzenleyici *rhizobacteria*’nın *Fomg*’ye karşı etkili olarak patojeniteyi azalttığını belirtmişlerdir (108). *Gigaspora margarita* (GIM), *Glomus etunicatum* (GE), *Glamus fasciculates* (GF), *Glomus intradices* (GI) ve *Glomus mosseae* (109) mikorizal funguslarının saksı denemelerinde *Fomg*’ye bağlı solgunluğu azaltma oranları araştırılmış; GE’nin %79 oranında başarılı olduğu belirtilmiştir (110). *Pseudomonas putida trevisan*’ın siderofor üreterek mikrokonidilerin çim borusunun uzamasını ve klamidosporların çimlenmesini engelleyerek patojen gelişimini azalttığı belirtilmiştir (111).

Mücadelede uygulanan başka bir yöntem olan kültürel yöntemler; temiz (fungus ari) materyal kullanımı, dayanıklı çeşit seçimi, bitki rotasyonunu kapsamaktadır. Uzun süreli rotasyonun (4 - 6 yıl) hastalığı azalttığı bildirilmiştir. Kültürel yöntemler zaman zaman kullanılsa da hastalığı azaltmada kesin çözümler olmadığı belirtilmiştir (37).

Sebzelerde aşılama da *Fusarium*, *Verticillium* gibi toprak kökenli hastalıklarla mücadelede kullanılmaktadır. Fakat aşılama anaç olarak kullanılan bitkinin dayanıklı olması gerekmektedir (112). Mevcut durumda *Fomg* dayanıklı patlıcan anaçlarına hassas patlıcan çeşitleri ile aşılanmaktadır. Aşılama yetiştiricilikte iyi bir çözüm olmakla birlikte ek bir

maliyet getirmektedir. Üretici hem istenilen çeşitte fide; hem anaç için üretim masrafları artmaktadır. Dayanıklı anaçlar üzerine yapılan aşılamlar ile; kök - ur nematodları ve diğer toprak kaynaklı patojenlerin de kontrolleri sağlanabilir. Patlıcanda *Fusarium solgunluğunu* kontrol edebilmek için toprağın bulaşık olmaması ve dayanıklı çeşit kullanmak gerekmektedir (97). Ayrıca patojenin topraktaki kalıcılığı göz önüne alındığında kontrol için en etkili yöntemin dayanıklı çeşit kullanımı olduğu görülmektedir (94).

2.14. DNA DİZİLEME TEKNOLOJİSİ

Nükleik asit dizilemesinde amaç; DNA - RNA molekülünde bulunan nükleotitleri belirlemektir. Nükleik asitlerin dizilimlerini belirlemek biyolojik araştırmalarda oldukça önemlidir. İlk dizileme çalışmaları tek iplikli RNA'dan başlamıştır. Tek iplikli RNA'ya sahip bakteriyofaj MS2' nin tüm genomu 1976 yılında sekanslanmıştır. Rekombinant DNA tekniklerinin gelişmesiyle DNA dizi analizleri de gelişmiştir. 1977 yılında Maxam - Gilbert ve Sanger tarafından 2 farklı DNA dizi analiz yöntemi bulunmuştur. 1986 yılında ilk tam otomatik sekans cihazı geliştirilmiştir. 1995 yılında *Haemophilus influenza*'ya ait ilk DNA dizisi sekanslanmış, 1996 yılında *Saccharomyces cerevisiae*'nın DNA'sı dizilenmiştir. 1998'de *Caenorhabditis elegans*'ın DNA dizisi çıkarılmış, 2000 yılında ise *Drosophila melanogaster*'in DNA dizisi yayınlanmıştır. 2000 yılında ilk bitki sekansı olarak *Arabidopsis thaliana* DNA'sı sekanslanmıştır. İnsandaki cinsiyet kromozomu olan Y kromozomunun sekanslanması da 2003 yılında gerçekleştirilmiştir (113, 114).

2.14.1. Birinci Nesil Dizileme Teknolojisi

Birinci nesil dizileme 1977 yılında; Maxam Gilbert yöntemi ve Sanger yöntemi ile ortaya çıkmıştır. Maxam Gilbert yöntemi; DNA dizilerinin çeşitli kimyasal reaksiyonlar ile bölünmesine, sonuçların jel elektroforezinde görüntülenmesine dayanmaktadır (115). Yöntemde DNA'da bulunan bazlar kimyasallarla değiştirilerek bu bazların bulunduğu yerden zincirin kırılması esas alınmaktadır. Maxam- Gilbert yöntemi oldukça karmaşıktır ve yavaş ilerlemektedir. Ayrıca zararlı kimyasalların kullanılması, büyük genomlarda kullanılamaması yöntemin dezavantajlarından. Maxam - Gilbert metoduna paralel olarak 1977 yılında Sanger metodu geliştirilmiştir. Sanger, Maxam - Gilbert yöntemine göre daha verimli, daha az kimyasal kullandığından hızla yaygınlaşmıştır. Sanger metodunun ana prensibi ise 3'OH grubu dehidroksile olan dideoksinükleotidler kullanılarak DNA zincir uzamasının durdurulmasıdır (116). Uzaması durdurulan

fragmentler kapiller elektroforez üzerinden boylarına göre ayrılır. Sanger yöntemiyle 400 - 800 baz uzunluğundaki DNA dizileri okunabilmektedir. Daha uzun bölgelerin okunabilmesi için, 'shotgun dizileme' adı verilen; istenilen bölgeleri parçalara ayırıp dizileyip sonra birleştiren yöntem geliştirilmiştir. Sanger ile dizilemede DNA parçaları dizilemeden önce klonlanmışsa elde edilen dizide klonlama vektörüne ait kısımların olması, 700 - 900 baz dizilemeden sonra kromotogram kalitesinin kötüleşmesi Sanger yönteminin dezavantajlarından. 2003 yılında tamamlanan 'İnsan Genom Projesi'nde de bu yöntem kullanılmıştır (117).

2.14.2. İkinci Nesil Dizileme Teknolojisi (Yeni Nesil Dizileme)

İnsan genom projesinin bitmesiyle birlikte 'Yeni Nesil Dizileme (YND)' ortaya çıkmıştır. İlk YND 2005 yılında kullanılmıştır. YND, birinci nesil dizilemenin maliyetinin yüksek olması ve veriminin kısmen düşük olmasından dolayı kullanılmaya başlanmıştır (114). YND; DNA' nın enzimatik yollarla kesilmesi, bu parçalarıyla kütüphane oluşturulması ve kütüphaneyi oluşturan DNA parçalarının çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Birçok DNA parçasının dizilenmesi eş zamanlı olarak gerçekleşmektedir (118). YND yöntemi ile genom, transkriptom, DNA - protein etkileşimleri belirlenebilir. RNA - mRNA, kromatin yapısı, metilasyon durumu ile ilgili çalışmalar da yapılabilir (119).

Yeni nesil dizileme, Roche 454'ün kullandığı pirodizileme ile başlamış, Illumina, SOLID, İyon Torrent ile devam etmiştir (115). Pirodizileme, yüksek işlem hacmine sahip olması, düşük maliyetli olmasından dolayı Sanger metodunun yerini almıştır. Klonlamaya ihtiyaç duyulmayan pirodizilemede, sentez yaparak dizileme prensibi uygulanmaktadır. Yöntem; DNA sentezi sırasında ortaya çıkan pirofosfatların (PPi) tespit edilmesi esasına dayanır. Yöntemin temelinde DNA polimeraz aktivitesinin kemilüminesan enzim ile tespit edilmesi vardır. Pirodizileme gerçek zamanlı kantitatif bir dizi analizi yöntemidir (120).

İyon Torrent tekniği sentez yaparak dizileme prensibini uygulayan başka bir yöntemdir. Yöntem, DNA'nın polimerizasyonu sırasında ortaya çıkan hidrojen iyonlarının saptanması temeline dayanmaktadır. Salınan hidrojen iyonlarının sayısına göre fazla elektronik sinyal elde edilmesiyle DNA dizisi belirlenir. Yöntem pH değişimini ölçme esasına dayanmaktadır. Yöntemin uygulaması kısaca şu şekildedir: Kalıp DNA dizisi içeren kuyuya nükleotidler verilir, nükleotid ile kalıp DNA eşleştiğinde Hidrojen iyonu salınımı olur bu da iyon sensörleri tarafından algılanır (120).

SOLID 2008 yılında geliştirilen ligasyon temelli bir sekanslama yöntemidir. Yöntemin temelinde emülsiyon PZR bulunmaktadır. Çoğaltılan ürünler cam bir yüzeyde, 4 farklı floresan boya etiketli 16 dinükleotid ile muamele edilir. Hibridizasyon ve ligasyon sonucundaki renklere göre nükleotidler belirlenir. Bu yöntem sayesinde DNA fragmentleri paralel olarak dizilenebilir. Ayrıca yöntem 2 baz kodlama mekanizması ile her bazı 2 defa sorgulayabilmektedir.

Tez çalışmasında da kullanılan Illumina, transkriptom dizileme, RNA dizileme (RNA-seq) çalışmalarında da sıklıkla kullanılmaktadır. Illumina yönteminde sentez yoluyla dizileme uygulanmaktadır. Yöntemin esasında DNA fragmentinin köprü oluşturarak çoğalması vardır. Flowcell üzerinde PZR ile kopyası elde edilen fragmentler dizilenir, okumalar hizalanarak birleştirilir. Aynı fragment birçok kez okunabildiği için okuma derinliği ve sayısı oldukça yüksektir (121).

Her sistemin avantajı ve dezavantajı olan özellikleri vardır. Bunlardan bazıları; okuma uzunluğu, maliyeti, çalışma kolaylığıdır (122).

2.14.3. Üçüncü Nesil Dizileme Teknolojisi

YND' den sonra 3. nesil dizileme ortaya çıkmıştır. 3. nesil dizileme ile tek molekül - gerçek zamanlı dizileme gerçekleşmektedir. Bu yöntemi yeni nesil dizilemeden ayıran fark ise amplifikasyona ihtiyaç duymamasıdır. 3. nesil teknolojisi Oxford Nanopore, Zero - mode wavguide, Pacific Bioscience, Helicos platformlarıyla gerçekleştirilmektedir (115).

Nanopor; lipid tabaka üzerine gömülü olarak bulunan biyoporum adından gelmektedir. Yöntemin temelinde; por oluşumunu sağlayan bakteriyel proteinlerin hücrelerde organik moleküllerin, küçük iyonların geçişine izin vermesi vardır. Nanoporda kullanılan α -haemolysin (α HL), *Staphylococcus aureus* tarafından üretilmektedir. Yöntemde α HL por boyunca DNA dizilimi gerçekleştirilir. Pordan geçiş esnasında akım seviyesi nükleotid varlığına bağlı olarak değişmektedir. Amplifikasyona ve floresan işaretlemeye ihtiyaç duymaması, eş zamanlı veri analizi yöntemin en büyük avantajlarından (123, 124).

Helicos Biosciences Cambridge tarafından ticarileştirilmiştir. Bu yöntem, restriksiyon enzimleriyle kesilen DNA örneklerinin (100 – 200 bp) katı yüzeydeki oligonükleotid primerler ile hibridizasyonunu temel almaktadır. Yöntemde, restriksiyon enzimi ile kesilen dizilere polyA kuyruğu eklenir, polyT bulunduran katı yüzey ile polyA eklenen DNA

dizileri hibridize olur. Hibridizasyondan sonra her kalıp sekanslanır. Etiketleme işlemi gerçekleştirilir. Floresanla işaretli bazlar eklenir ve cihazdaki lazer işaretli bazı aydınlatır (124).

SMRT (Single Molecule, Real-Time / Tek molekül, gerçek zamanlı) olarak da adlandırılan Pacific Biosciences, tek molekül DNA dizileme yöntemidir. 2010 yılında piyasaya sürülen yöntem Zero - mode waveguide (ZMW) içerisinde immobilize edilen DNA polimeraz enzimini temel olarak almaktadır. Dizileme esnasında polimeraz ile DNA dizisi bağlanır. 4 farklı floresan boya ile işaretli 4 nükleotid de ortamda hazır bulunur. DNA polimeraz tarafından bir nükleotid eklendiğinde floresan etiket bölünür; ZMW tarafından gözlemlenemez. Bu esnada dedektör nükleotid birleşmesi esnasında ortaya çıkan floresan sinyali tespit eder. Boyaya karşılık gelen floresan sinyale göre baz belirlenir. Yöntemde yıkama, PZR gibi aşamaların olmaması avantajlar arasındayken; maliyet ve örnek hazırlığının zor olması dezavantajlar arasındadır (114, 124).

Birinci, ikinci ve üçüncü nesil dizilemeler arasında birçok özellik bakımından farklılıklar bulunmaktadır. Bu farklılıklar tablo halinde Çizelge 2.7.'de verilmiştir. Dizileme yöntemleri de kendi aralarında farklı özellikler göstermektedir. Bazı dizileme yöntemlerinin, kullandıkları yöntem, çalışma süresi ve okuma uzunluğu (bç) bakımından gösterdikleri farklılıklar Çizelge 2.8.'de verilmiştir.

Çizelge 2.7. Birinci, ikinci ve üçüncü nesil dizilemeler arasındaki farklar (114).

	Birinci Nesil Dizileme	İkinci Nesil Dizileme	Üçüncü Nesil Dizileme
Okuma Doğruluğu	Yüksek	Yüksek	Yüksek
Verim	Düşük	Yüksek	Yüksek
Maliyet	Yüksek	Yüksek	Düşük
Zaman	Saatler	Günler	Dakikalar
RNA-dizileme	cDNA kullanarak	cDNA kullanarak	cDNA kullanarak, doğrudan RNA kullanarak
Örneğin hazırlanması	PZR'ye gerek yok	PZR'ye gerek var	PZR'ye gerek yok

Çizelge 2.8. Bazı yeni nesil DNA dizileme platformlarının karşılaştırılması (124).

Dizileme Yöntemi	Kullanılan Yöntem	Çalışma Süresi	Okuma Uzunluğu (bp)
Roche 454 FLX (Pirodizileme)	Sentez aracılığı ile dizileme	24 saat	400-500
Illumina (Solexa)	Sentez aracılığı ile dizileme	3-10 gün	100
İyon Torrent	Sentez aracılığı ile dizileme	2 saat	200
ABI Solid	Ligasyon ile dizileme	1-2 hafta	50
Helicos	Ten zincir dizileme	8 gün	25-55
Pacific Biosciences	Tek zincir dizileme	Yaklaşık 1 saat	1300

2.15. TRANSKRİPTOM DİZİLEME

Transkriptom, bir hücredeki transkriptlerin tamamının çeşidinin, miktarının eş zamanlı olarak incelenmesidir. Transkriptom ile; kodlanmayan RNA'ları, gene ait ekspresyon düzeyini, tek nükleotid farklılıklarını, splicing mekanizmasını, post - transkripsiyonel modifikasyonları, insersiyonları, delesyonları, translokasyonları, farklı süreçlerdeki dokunun transkript seviyesindeki farklılıkları belirleyebilmek mümkündür (125). Transkriptom dizilemesi - RNA dizileme (RNA-Seq) tekniği ile bir örnekteki RNA'nın durumu ve organizasyonunu kantitatif olarak ortaya konulabilmektedir. RNA sekanslamada hibridizasyon temelli ve sekans temelli yaklaşımlar kullanılmaktadır. Hibridizasyon temelli yaklaşımda; mikrodizin (mikroarray) - oligomikroarray kullanılmaktadır. Hibridizasyon temelli yaklaşımda floresan işaretleme kullanılmaktadır. Yöntemin dezavantajı ise farklı deneylerdeki ekspresyon seviyesini belirlemek genelde zor ve karmaşık normalizasyon metotları gerektirmesidir. Sekans bazlı yaklaşımda, başta Sanger ile cDNA ve EST kütüphaneleri kullanılmıştır fakat bu yöntemler pahalı ve kantitatif olmadığından 'tag bazlı' metotlar kullanılmaya başlanmıştır. RNA-seq ile *Saccharomyces*, *Arabidopsis thaliana*, fare, insan hücreleri sekanslanmıştır. RNA-seq; deep - sekanslama kullanır. RNA, cDNA'ya çevrilir. Okumalar sekans teknolojisine bağlı olarak 300 - 400 bp uzunluğunda olabilir ve Illumina, Roche, Solid vb. platformlar kullanılmaktadır. RNA-seq'in avantajları arasında: hibridizasyon temelli olmaması, mevcut genomik diziye karşılık gelen transkriptleri tespit edebilmesi, transkriptlerin sınırlarının kesin yerlerini belirleyebilmesi, kısa okumalar yapabilmesi, 2 ekzonun nasıl birleştiği hakkında bilgi sağlaması, transkript bölgelerindeki sekans varyasyonlarını ortaya koyabilmesi bulunmaktadır. Mikroarray'e göre avantajı çok büyük miktardaki transkript farklılıklarını bile ölçebiliyor olmasıdır. Ayrıca mikroarray ile doğrulanamayan transkriptler RNA-seq ile doğrulanabilir. RNA-seq'de diğer tüm genom dizilemelerden farklı olarak; transkriptom analizinde RPKM (read of per kilobase exon per million reads:

bir gene haritalanmış olan okuma sayısı) değerleri analiz edilir (126). RNA-Seq ile mikroarray ve cDNA/EST'nin karşılaştırılması Çizelge 2.9.'da verilmiştir.

Çizelge 2.9. RNA-Seq ile mikroarray ve cDNA/EST'nin karşılaştırılması (127, 128).

Teknoloji	RNA-Seq	Mikroarray	cDNA/EST
Özellikleri			
İşlem kapasitesi	Yüksek	Yüksek	Düşük
Temel aldığı prensip	Yeni Nesil Dizileme	Hibridizasyon	Sanger Sekanslama
Rezolüsyon	Tek Baz	2-100 baz arası	Tek baz
Uygulama			
Aynı genin farklı izoformlarını ayırt edebilme	Evet	Sınırlı	Evet
Allelik ekspresyonları ayırt edebilme	Evet	Sınırlı	Evet
Eş Zamanlı transkriptlerin dizilenmesi-ekspresyon seviyelerini belirleyebilme	Evet	Evet	Eş Zamanlı transkriptlerin dizilenmesi için uygun
Dezavantajı			
İhtiyaç duyduğu RNA miktarı	Düşük	Yüksek	Yüksek
Maliyet	Düşük	Yüksek	Yüksek

2.16. RNA-SEQ DİZİLEME BASAMAKLARI

RNA-seq tekniği, yeni nesil dizileme teknolojilerini kullanır (129). RNA-Seq dizileme basamakları şu şekildedir:

- Toplam RNA eldesi
- Bioanalizer ile RNA kalitesi ve miktarının ölçülmesi
- Toplam RNA'dan rRNA uzaklaştırılması
- cDNA sentezi
- Kütüphane hazırlama
- Sekanslama
- Veri analizi
- Okumaların hizalanması
- Transkriptlerin birleştirilmesi
- Transkript miktarının belirlenmesi

2.17. ILLUMİNA

2006 yılında ticarileşen Solexa dizileme, 2007 yılında Illumina tarafından satın alınmıştır. Illumina / Solexa, dönüştürülebilir (floresan işaretli) terminatör ile dizileme yaklaşımını kullanmaktadır. Sentez aracılığı ile dizileme gerçekleştirmektedir. Dizilemeden önce, DNA kütüphanelerinin klonal amplifikasyonu ‘köprü amplifikasyonu’ ile gerçekleşir. Sekanslama, DNA polimeraz aracılığıyla tersinir bir sonlandırıcıyla birleştirilmiş floresan nükleotidlerin dahil edilerek optik okumasına dayanmaktadır. Tek bir floresan işaretli tersinir sonlandırıcıya bağlı dNTP, her döngü esnasında nükleik asit zincirine dahil edilir ve elde edilen floresan sinyal görüntülenir. Sonrasında sonlandırıcı ve floresan boya bir sonraki etiketli dNTP’nin eklenmesine izin vermek için dahil edilen dNTP’den ayrılır. Illumina platformu, uç dizileme yeteneğine sahiptir. Bu özelliği sayesinde DNA parçasının her iki ucundan gelen verileri okuyabilmektedir. Illumina kullandığı tersinir sonlandırıcı teknolojisi ve uç dizileme teknolojisi ile birlikte %0.1 gibi bir hata oranıyla oldukça doğru oranda dizileme yapabilmektedir. Illumina farklı okuma sayılarına sahip platformlar içermektedir. Bunlar: iSeq, MiniSeq, MiSeq, NextSeq550, NextSeq1000, NextSeq2000, Novaseq6000’dir. Illumina platformlarından MiSeq, 2 X 300 bp’lik okumayı 56 saat gibi uzun bir sürede yapabilirken; MiniSeq, NextSeq550 gibi yeni çıkan platformlar iki kanallı SBS teknolojisini kullanarak (4 bazı tararken döngü başına iki adet görüntü verebilen) kalite ve doğruluk oranını da koruyarak veri işleme süresini azaltmaktadır (130). Illumina sistemi Sanger metoduna göre daha hızlıdır; çünkü aynı anda birçok fragment analiz edilebilmektedir. Ayrıca Illumina’da fragment kütüphaneleri kullanılmakta bu da sekanslamanın doğru gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrolünü mümkün kılmaktadır. Illumina sekanslamanın dezavantajı ise pahalı ekipmanlara ihtiyaç duymasıdır.

2.18. TRANSKRİPTOM DİZİLEME TEKNOLOJİSİ İLE HEDEF GENLERİN BELİRLENMESİ

Transkriptom analizleri cDNA - AFLP, EST, mikrodizin, RNA dizileme yöntemleriyle belirlenebilmektedir. cDNA - AFLP, özellikle bitkilerde farklı koşullarda ilgilenilen genlerdeki ifade değişimlerini belirlemede kullanılır. EST’ler genlerin ifade analizinde kullanılmaktadır. Mikrodizin analizi ile genlerin ifade analizleri ve gen polimorfizmleri hakkında bilgi sağlanabilmektedir (131). RNA-seq RNA’nın durumunu ve organizasyonunu belirleyen kantitatif veriler elde edilmesini sağlayan etkin bir yöntemdir. RNA-seq ile, ekzonların nasıl birleştiği hakkında bilgi sağlanabilir ve transkript

bölgelerdeki varyasyonları ortaya koyabilir (126). Transkriptom analizleri farklı amaçlar için yapılmaktadır. Patlıcanda partenokarpi, antosiyanin yolaklarının aydınlatılması, evrimsel süreç gibi konular üzerine yürütülen transkriptom analizleri mevcutken; hastalıklara yönelik transkriptom çalışmaları sınırlı sayıdadır. Patlıcanda 'rfo-sal' lokusu taşıyan *S. aethiopicum* X *S. melongena* melezine Fusarium ve Verticillium etmenleri bulaştırılmış; hastalığa savunma yanıtı oluşturan aday genlerin ifadesi köklerde qRT-PCR, SSH, mikrodizin analizleriyle belirlenmiştir (64). *S. melongena* - *S. torvum* için RNA düzeyinde transkriptom sekanslama yapılmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Sonuçlar protein düzeyinde de değerlendirilmiştir (132). Yine patlıcanın kültür formunda bakteriyel solgunluğa neden olan '*Rolstonia solanacearum*' etmeni ile ilişkiyi belirlemek için etmene dayanıklı - hassas bitkilerin inokülasyondan önce ve sonra RNA-seq ile transkriptomları sekanslanmış; ekspresyonu değişen gen sayıları belirlenmiştir (109). *S. incanum* ve *S. aethiopicum* türlerinde RNA dizileme ile transkriptom analizi yapılmış; çalışmanın sonucu *S. incanum* ve *S. aethiopicum* arasındaki gen dizileri ve allel varyasyonları hakkında geniş bilgi ortaya koyarken, patlıcan yetiştiriciliği ile ilgili metabolik yollarda yer alan hedef genlerin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlamıştır. Çalışmada tespit edilen moleküler markırların (özellikle ıslah programları için) kullanılabileceği bildirilmiştir (133).

Kültür patlıcanının evrimsel sürecini daha iyi anlayabilmek için yapılan çalışmada; *S. aethiopicum*, *S. integrifolium*, *S. sisymbriifolium* ve *S. melongena*'ya ait çeşitlerde RNA dizileme düzeyinde transkriptom analizi yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda, patlıcanda etkiler (yapılan melezlemeler, oluşturulan mutasyonlar vb.) sonucu oluşan meyve özellikleriyle ilgili bir gen varlığı tespit edilmiş, hastalık - stres direnciyle alakalı genler bulunmuş; biyotik stresin ve çevresel değişikliklerin kültür patlıcanlarının oluşumunda önemli faktörler olduğu belirtilmiştir (134). RNA dizileme analiziyle antosiyanin mekanizmasının incelendiği bir başka çalışmada; mutasyonla elde edilen beyaz patlıcan ve mor renkteki yabani patlıcan kullanılmıştır. Çalışma sonuçlarının antosiyanince zengin patlıcan çeşitlerinin ıslahı sürecinde kaynak genetik veri olabileceği bildirilmiştir (135). Patlıcanda partenokarpik meyve oluşumunun anlaşılması üzerine yapılan başka bir transkriptom sekanslamasında; 1 partenokarpik ve 2 partenokarpik olmayan patlıcan hattı kullanılmış, çalışmanın sonucunda partenokarpik olan ve partenokarpik özelliğe sahip olmayan patlıcanların kapsamlı transkriptom profilleri ortaya çıkarılmıştır (136).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Bitkilerde çeşit geliştirme aşamalarında yapılan melezlemeler sonucu ortaya çıkan yeni genetik yapı generasyonlar boyunca değişmektedir. Ana – baba - ebeveynlerin yanında melez generasyonlardaki genom yapısı (gen dağılımları ve fonksiyonları) hibrit bitkilerdeki dayanıklılık göstergesi olarak ön plana çıkmaktadır. Hibrit bitkilerdeki genom boyu gen dağılımlarının belirlenmesi ise dayanıklı - hassas genomlardaki açılımları, değişimleri ortaya koyucu bulguları oluşturmaktadır.

Fusarium oxysporum f. sp. *melongenae*'ya dayanıma yönelik yapılan moleküler çalışmalara bakıldığında ise, hastalığa dayanıklılığın kalıtımının nasıl olduğu ve dayanıklı çeşitlerin seçiminde kullanılabilecek markırların geliştirildiği görülmektedir. Moleküler düzeyde dayanıklılığın incelenmesi için yapılan çalışmalarda dayanıklılığın tek bir gene bağlı olduğu belirtilmiştir (70, 93) ve dayanıklılığın tespitine yönelik olarak yapılan çalışmalarda da çeşitli markırların geliştirildiği belirtilmiştir (60, 93). Bahsi geçen araştırmalardan farklı olarak etmenle ilişkili genlere toplu bakış imkânı sunan RNA-Seq tekniğinin bu amaçla kullanılmadığı görülmektedir. RNA-Seq analizlerinde bitki RNA materyali kullanılarak, etmene karşı başta savunmada rol alan tüm genler ile bu genlerin ifadesi olmak üzere, bu genler ile ilgili yolaklar, genlerin var ise izoformları, belirlenen genlerin 5' ve 3' uçları belirlenebilmektedir. Ayrıca karşılaştırmalı transkriptom analizleri ile gen(ler)de olası tek nükleotid değişimleri (markır tespitine yönelik ileriki çalışmalara yardımcı olabilecek), insersiyon, delesyon durumları da tespit edilebilmektedir. Diğer bir deyişle RNA-seq analizleri yukarıda bahsedilen çalışmalardan farklı olarak etmene dayanıklılıkta rol alan genlerin tümüne toplu bir bakış sağlamakta, ilgili genlerin hepsini ortaya çıkarmaktadır. Mevcut bilgilerimiz ışığında projede kullanılması planlanan patlıcan türleri (Anamur ve *S. macrocarpon*) ve hibritlerinde *Fusarium*'a yönelik herhangi bir RNA-Seq araştırması bulunmamaktadır. Bu çalışma *Fomg* enfeksiyonuna ve kullanılan tür (*S. melongena*, *S. macrocarpon*) ve hibritlere yönelik ilk transkriptom araştırması özelliğindedir.

Bu çalışmada yabani patlıcanda bulunan *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* dayanıklılığını türler arası melezlemelerle F1 ve F2 generasyonuna geçirebilmek ve generasyonlar boyu transkriptom analizi yaparak dayanıklılığa aday genleri tespit etmek amaçlanmıştır.

4. MATERİYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERİYAL

***Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*'ya hassas tür olarak:** *Solanum melongena* türü ve yerli çeşit olarak Anamur, Pala, Yamula çeşitleri kullanılmıştır. Bu tür melezlemelerde ana olarak kullanılmıştır.

***Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*'ya dayanıklı tür olarak:** *S. linneanum*, *S. anguivi*, *S. aethiopicum* gr. *Gilo*, *S. insanum*, *S. incanum*, *S. Integrifolium*, *S. macrocarpon* türleri kullanılmıştır. Bu tür melezlemelerde baba olarak kullanılmıştır.

Yabani türler ile yerli çeşitlerde melezleme başarısı türler arası melezleme olduğu için düşük; çimlenme oranları az olabilmektedir. Çimlenme oranı ve melezleme başarısı ile ilgili olan bu problemleri en aza indirebilmek için; ilk olarak yabani türlere ait birden fazla örnek materyal kullanılmıştır; melezleme başarılarına göre, en iyi sonucu veren anne - baba materyal olarak seçilmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan ana (Anamur çeşidi) ve baba türüne (*Solanum macrocarpon*) ait fotoğraflar Şekil 4.1.'de verilmiştir



a



b

Şekil 4.1. a) Tez çalışmasında ana olarak kullanılan Anamur çeşidi b) baba olarak kullanılan *Solanum macrocarpon* türü.

Tez çalışmasında kullanılan *Solanum integrifolium*, *Solanum macrocarpon* türlerine ait fotoğraflar Şekil 4.2.'de verilmiştir.



a



b

Şekil 4.2. a) *Solanum integrifolium* b) *Solanum macrocarpon* 'a ait resimler.

4.2. YÖNTEM

4.2.1. DTG VE HYÇ BİTKİLERİN YETİŞTİRİLMESİ

Dayanıklı türe ait genotip (DTG) ve hassas yerli çeşit (HYÇ) tohumları, içerisinde torf bulunan plastik çimlendirme kaplarına ekilmiş; 24 - 28 °C 16 / 8 saat gündüz / gece ayarlı iklim odasına yerleştirilmiştir. Fideler sonrasında 1 : 1 oranında steril torf - perlit karışımı viyollere şaşırtılmış; gerekli bakımları yapılan fideler 3 - 4 gerçek yapraklı aşamaya geldiklerinde iklim kontrollü seraya aktarılmıştır.

Bitkiler seraya çift sıralı olarak uygun aralıklarla dikilmiş, can suları verilmiştir. Sonraki sulamalar damla sulama ile gerçekleştirilmiştir. Bitkilere ihtiyaç durumunda budama – gübreleme yapılmıştır.



Şekil 4.3. Çalışmanın yapıldığı seraya ait fotoğraflar.

4.2.2. DTG VE HYÇ BİTKİLERİN MELEZLENMESİ

Melez bitkileri elde edebilmek için dayanıklı olduğu düşünölen baba genotipi (DTG) ile hassas ana çeşidi (HYÇ) melezlenmiştir. Melezlemeler dişi organın reseptif olduğu sabah erken saatlerinde yapılmıştır. Melezlemede kullanılan ana bitkilerin çiçek tomurcukları anterler patlamadan önce pens ile emasköle edilerek yabancı tozlanma olmaması için kese kağıdı ile izole edilmiştir. Melezlemede kullanılan baba bitkilerin polenleri ise tam çiçeklenme (taç yaprakları açılmak üzereyken) aşamasındayken çiçek tomurcuklarından alınarak ana ebeveynin dişicik tepesine sürölerek bırakılmıştır. Melezlemesi tamamlanan bitkiler etiketlenerek keseyle izole edilmiştir. Melezlemelerde ana olarak (HYÇ), Anamur F2, Anamur F4, Yamula ve Pala kullanılmıştır. Melezlemelerde baba olarak ise (DTG) *S. anguivi* (29), *S. insanum* (60), *S. linneanum* (37), *S. linneanum* (33), *S. linneanum* (10), *S. aethiopicum* gr. *Gilo*, *S. acelatum*, *S. acelatum* (11), *S. integrifolium*, T22AÇ, *S. incanum* (21), *S. incanum*, *S. macrocarpon*, *S. sisymbriifolium* kullanılmıştır. Her bitkiden 5 melezleme yapılmıştır. Patlıcan çiçeğine ve melezleme çalışmasına ait fotoğraflar Şekil 4.4.'te verilmiştir.

Çizelge 4.1. HYÇ ve DTG melezleme kombinasyonları ve melezleme sayısı.

HYÇ X DTG Melezleme Kombinasyonları (Bitki no)	Yapılan Melezleme Sayısı
Anamur F2 X <i>S. insanum</i> (60)	5
Anamur F2 X <i>S. aethiopicum</i> Gilo	5
Anamur F2 X <i>S. acelatum</i>	5
Anamur F2 X <i>S. integrifolium</i>	5
Anamur F2 X <i>S. linneanum</i> (37)	5
Anamur F2 X T22AÇ	5
Anamur F2 X <i>S. incanum</i> (21)	5
Anamur F4 X <i>S. macrocarpon</i>	5
Anamur F4 X <i>S. incanum</i>	5
Anamur F4 X <i>S. linneanum</i> (33)	5
Anamur F4 X <i>S. anguivi</i> (29)	5
Anamur F4 X <i>S. sisymbriifolium</i>	5
Anamur F4 X <i>S. acelatum</i> (11)	5
Anamur F4 X T22AÇ	5
Yamula X <i>S. incanum</i>	5
Yamula X <i>S. linneanum</i> (37)	5
Yamula X <i>S. insanum</i> (60)	5
Pala X <i>S. linneanum</i> (37)	5
Pala X <i>S. aethiopicum</i> Gilo	5
Pala X <i>S. linneanum</i> (10)	5



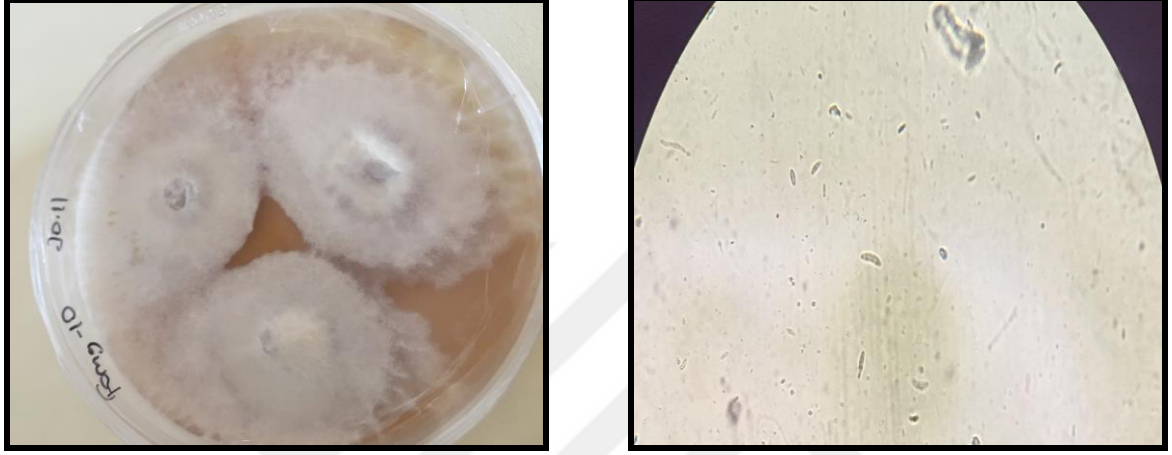
Şekil 4.4. Patlıcan çiçeğine ve melezleme çalışmalarına ait fotoğraf.

4.2.3. PATOJEN TESTLEMESİNDE KULLANILACAK OLAN FOMG İZOLATLARININ TEMİNİ VE ÇOĞALTILMASI

Patojenite testlemesi için kullanılacak olan *Fusarium oxysporum melongenae* izolatlarının temini Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim dalı Mikoloji laboratuvarından sağlanmıştır.

Patojenite testlemeleri için spor süspansiyonu hazırlanmıştır. Spor süspansiyonları pH'sı 6.5 olan Patates Dextroz Agar (PDA) ortamında 24 °C'de 3 - 4 haftalık fungus kültürlerinden hazırlanmıştır. Sporlar besi ortamından bistüri ile kazınarak erlenmayere

alınmıştır. İçerisine steril saf su eklenmiştir. Saf su ilavesinden sonra çalkalanarak homojen hale getirilen süspansiyondan agar ve misel parçaları tülden süzülerek uzaklaştırılmıştır. Süzülen süspansiyon yeni erlenmayere aktarılmıştır. Süspansiyonun spor yoğunluğu hemositometre kullanılarak mikroskop yardımıyla belirlenmiştir. Spor yoğunluğu 1×10^6 konidi / ml olacak şekilde ayarlanmıştır (137). *Fusarium oxysporum melongenae*'nin PDA ortamındaki makroskobik ve mikroskobik görüntüsü Şekil 4.5.'de verilmiştir.

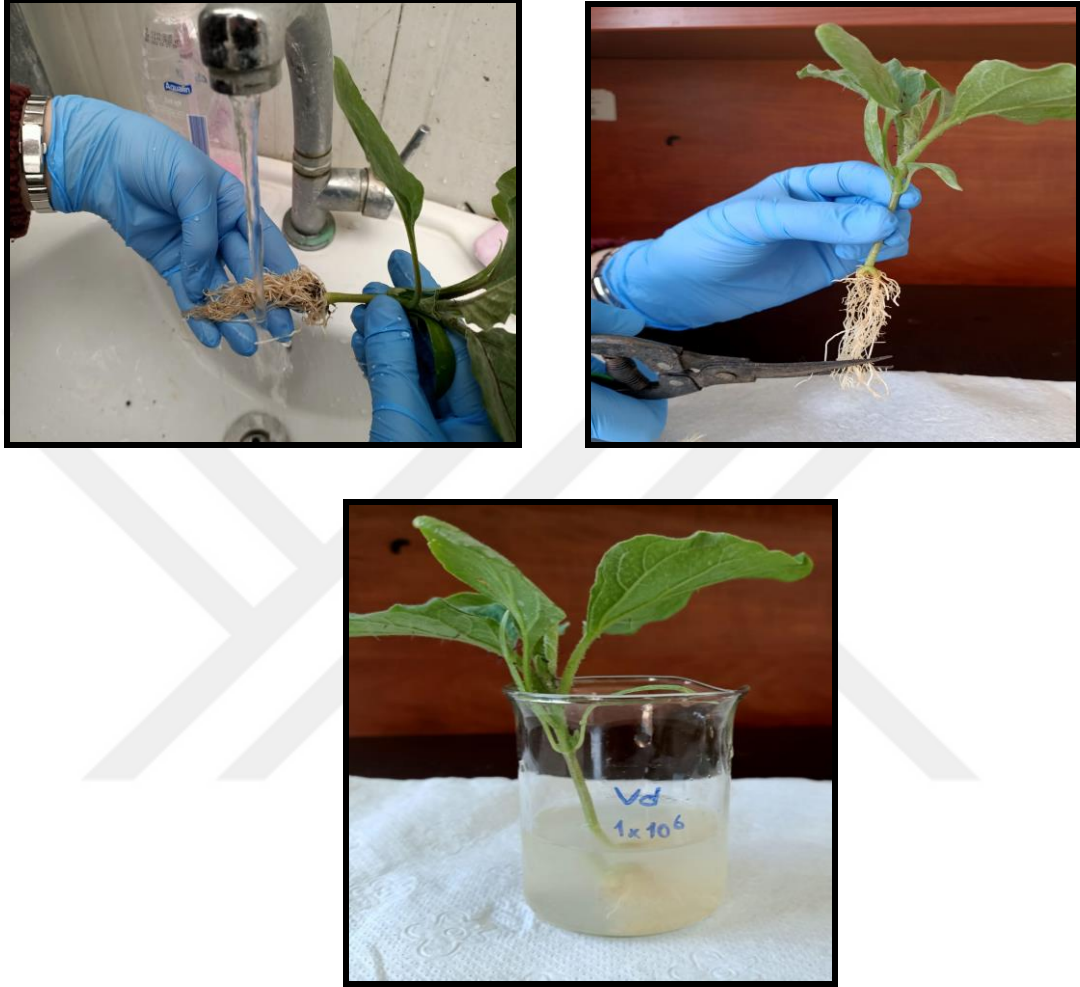


Şekil 4.5. *Fusarium oxysporum melongenae*'nin PDA'daki makroskobik ve mikroskobik görüntüsü.

4.2.4. DTG - HYÇ - F1 BİTKİLERİNİN KLASİK PATOJENİTE TESTLEMELERİ

Yapılan melezlemelerden elde edilen tohumlar uygun ortamlarda yetiştirilmiş; yetiştirilen F1 bitkilerine patojen testlemesi yapılarak en dayanıklı melez bitkilerin bulunması amaçlanmıştır. Patojen testlemesinin yanında, çalışmanın ilerleyen aşamalarında gerekecek F2 bitkileri için melezlenen bitkinin tohumları + 4 °C'de kese kağıtları içerisinde saklanmıştır. *Fusarium*'a karşı dayanıklılık için yapılan patojen testlemesinde inokülasyon yöntemi olarak fide kök daldırma metodu kullanılmıştır. 4 - 5 yapraklı aşamaya gelen fideler kökleriyle birlikte viyollerden çıkartılmış, musluk suyunda yıkandıktan sonra *Fomg* uygulaması yapılacak olan fidelerin kök uçları kesilerek traşlanmıştır. Bu sayede yara dokusu oluşumu sağlanmıştır. Kök ucu traşlanan fideler 10^6 mikrokonidi / ml olarak beherlerde hazırlanan patojen solüsyonuna 15 dakika süreyle daldırılmıştır (138, 139). Kontrol olarak kullanılacak fideler aynı şekilde musluk suyu altında yıkanarak 15 dakika steril distile suda bekletilmiştir. Patojen uygulamasından sonra fideler 2 : 1 : 1 oranında toprak - torf - perlit karışımından hazırlanan ortama buharla dezenfekte edilmiş saksılara dikilmişlerdir. Testlemeler 5 deneme 1 kontrol bitkisinde yapılmıştır. Patojen testlemesi yapılan bitkiler 16 saat ışık 8 saat karanlık periyotta; %60 nisbi nem, gündüz 25 ± 2 °C, gece

20±2 °C sıcaklıktaki iklim kontrollü serada gelişmeye bırakılmıştır (140). Bitkiler düzenli aralıklarla sulanmış, iki haftada bir 20 – 10 – 12, N, P, K içerikli gübreleme yapılmıştır. Patojen uygulamasında çeşitli aşamalara ait fotoğraflar Şekil 4.6.'da verilmiştir.



Şekil 4.6. Patojen uygulamasına ait fotoğraflar (Sırasıyla: köklerin çeşme suyunda yıkanması, traşlanarak yara dokusunun oluşturulması, patojen solüsyonunda bekletilmesi).

4.2.5. PATOJENİTE TESTLEMELERİ SONUCUNDA EN İYİ DAYANIKLILIK GÖSTEREN F1 KOMBİNASYONLARININ BELİRLENMESİ

F. oxysporum f. sp. *melongenae*'nın sebep olduğu hastalık belirtileri patojen inokülasyondan 4 hafta sonra F1 bitkilerinde değerlendirilmiştir. Hastalık şiddetleri ve belirtileri 0 - 4 skalası kullanılarak belirlenmiştir (137). Bu skorlamaya göre: 0 - 1 skalasına sahip bitkiler dayanıklı, 3 - 4 skalasına sahip bitkiler hassas olarak belirlenmiştir.

- 0- Simptom göstermeyen bitkiler
- 1- Solgunluk başlangıcı, alt yapraklarda hafif yaprak sararması ve nekroz

- 2- Bitkinin neredeyse yarısında solgunluk, klorosis, nekroz ve gelişme geriliği
- 3- Bitkilerin genelinde solgunluk, yapraklarda kuruma, uçlardan başlayan ölümler
- 4- Ölü bitkiler

Hastalık şiddetlerinin skorlanması sonucunda 0 - 1 skorlamasına sahip bitkiler dayanıklı olarak kabul edilmiştir. Dayanıklı F1 bitkilerinin melez kombinasyonları:

Anamur F2 X *S. aethiopicum Gilo*

Pala X *S. aethiopicum Gilo*

Anamur F2 X *S. insanum*

Anamur F4 X *S. macrocarpon*'dur. Dayanıklı olduğu belirlenen kombinasyonlara ait bitkilerin fotoğrafları Şekil 4.5.'de verilmiştir.





Şekil 4.7. Skorlamalar sonucu dayanıklı olduğu belirlenen kombinasyonlara ait bitkilerin fotoğrafları (Sırasıyla: Anamur F2 X *S. aethiopicum Gilo*, Pala X *S. aethiopicum Gilo*, Anamur F4 X *S. macrocarpon*).

4.2.6. PATOJENİTE TESTLEMELERİ SONUCUNDA EN YÜKSEK DAYANIKLILIK GÖSTEREN F1 BİTKİLERİNİN YETİŞTİRİLMESİ VE KENDİLEMELERİN YAPILMASI

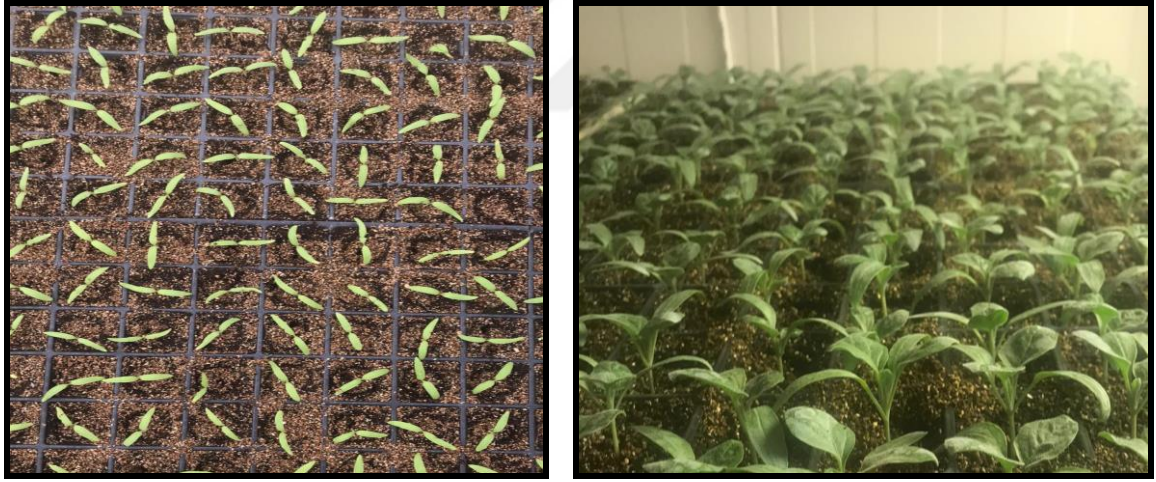
Yabani türler ile yerli çeşitlerde melezleme başarısı düşük olup; melezleme gerçekleşse bitki elde edilse bile bitkinin kısır bitki olma ihtimali oldukça fazladır. Bu amaçla dayanıklı olduğu skorlamalarla belirlenen, önceden ayrılan 4 adet F1 bitkisinin tohumları öncelikle plastik çimlendirme kaplarına ekilmiş, 24 - 28 °C 16 / 8 saat gündüz / gece ayarlı iklim odasına yerleştirilmiştir. Her bitkiden 30' ar tohum ekilmiştir. Fideler sonrasında 1 : 1 oranında steril torf - perlit karışımı viyollere şaşırtılmış; gerekli bakımları yapılan fideler 3 - 4 gerçek yapraklı aşamaya geldiklerinde iklim kontrollü seraya aktarılmıştır. Bitkiler seraya çift sıralı olarak, uygun aralıklarla dikilmiş can suları verilmiştir. Sonraki sulamalar damla sulama şeklinde gerçekleştirilmiştir. Bitkilere ihtiyaç durumunda budama – gübreleme yapılmıştır.

Yetiştirilen Anamur F2 X *S. aethiopicum Gilo*, Pala X *S. aethiopicum Gilo*, Anamur F2 X *S. insanum*, Anamur F4 X *S. macrocarpon* F1 melez kombinasyonlarına ait bitkiler kendilenerek F2 bitkileri elde edilmiştir. Kendilemede çiçekler açılmadan ve tozlanma olmadan önce bitkiler ayrı ayrı torbalar veya keseler içine alınarak izole edilmiş, yabancı çiçek tozlarından korunmuştur. Burada yapılan kendilemenin amacı istenilen özelliği sonraki generasyonlarda daha iyi ortaya çıkarabilmek, homozigot bireyler elde edebilmektir. Dayanıklılık gösteren F1'lerin tamamında kendileme yapılarak, en iyi meyve

tutumuna sahip ve kısır olmayan bitkinin bulunması amaçlanmıştır. Yapılan kendilemeler sonucunda tohum verebilen, çimlenme kapasitesi, meyve tutumu en iyi olan bitki Anamur F4 X *S. macrocarpon* kombinasyonundan belirlenmiştir. Bunun sonucunda, tez çalışmasının ileriki aşamalarında kullanılacak olan materyal olarak Anamur F4 X *S. macrocarpon* kombinasyonu seçilmiştir. Kendilemeler sonucunda Anamur F4 X *S. macrocarpon* meyvelerinden toplanan tohumlar sonraki aşamada kullanılmıştır.

4.2.7. DTG, HYÇ, F1 VE F2 BİTKİLERİNİN YETİŞTİRİLMESİ

Patojen inokülasyonu için amaçlanan deneme desenindeki bitki sayısı 3 adet biyolojik tekrarlı ana, 3 adet biyolojik tekrarlı baba, 1 adet dayanıklı F1, 1 adet dayanıklı F2 - 1 adet hassas F2'dir. Anamur F4 X *S. macrocarpon* F2 bitkilerinden yeterli sayıda dayanıklı bitkiyi bulabilmek için fazla sayıda bitki elde etmek gerekmektedir. Bu amaç doğrultusunda F2 bitkisinden yaklaşık 200 adet tohum ekilmiştir. F1 bitkisinden, ana ve babadan ise 10'ar tohum plastik çimlendirme kaplarına ekilmiş, sonrasında viyollere alınan fideler uygun koşullarda yetiştirilerek inokülasyona hazır hale getirilmiştir.



Şekil 4.8. Viyollerde yetiştirilen Anamur F4 X *S. macrocarpon* F2 bitkilerine ait fotoğraflar.

4.2.8. DTG, HYÇ, F1 VE F2 BİTKİLERİNE *FUSARIUM OXYSPORUM* İZOLATININ İNOKÜLASYONU

Fusarium oxysporum melongena izolatu, dayanıklılık seleksiyonu sonucunda dayanıklı olduğu belirlenen ve uygun koşullarda yetiştirilen Anamur X *S. macrocarpon* F2 ve F1 bitkilerine, *S. macrocarpon*'a ve Anamur F4 bitkisine (ana - baba) 4.2.4 başlığında belirtildiği şekilde inoküle edilmiştir. Patojen uygulamasından sonra fideler 2 : 1 : 1

oranında toprak – torf - perlit karışımından hazırlanan buharla dezenfekte edilmiş saksılara dikilmişlerdir. Patojen testlemesi yapılan bitkiler 16 saat ışık 8 saat karanlık periyotta; %60 nisbi nem, gündüz 25 ± 2 °C, gece 20 ± 2 °C sıcaklıktaki iklim kontrollü serada gelişmeye bırakılmıştır (140).



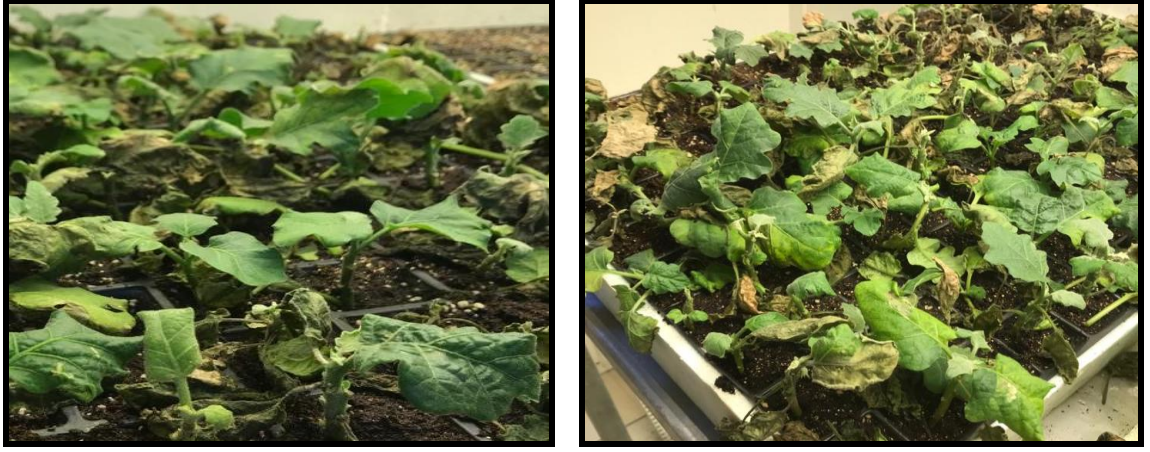
Şekil 4.9. Patojen uygulamasına ait fotoğraflar (Sırasıyla: köklerin çeşme suyunda yıkanması, patojen solüsyonunda bekletilmesi).

4.2.9. İNOKULASYONDAN SONRA DAYANIKLI - HASSAS F2 BİTKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Toplam 200 adet Anamur X *S. macrocarpon* F2, 10 adet Anamur X *S. macrocarpon* F1, 10 adet *S. macrocarpon*, 10 adet Anamur bitkisine *Fusarium oxysporum melongena* izolatu inoküle edilmiş, inokulasyondan sonra bitkiler önceki bölümlerde verildiği üzere uygun koşullarda yetiştirilmiştir.

İnokulasyondan yaklaşık 3 - 4 hafta sonra, fungusun kök boğazında etkisinin görülmeye başladığı dönemde bitkilerde hastalık şiddetleri ve simptomları 0 - 4 skalası kullanılarak 4.2.5 başlığında verildiği şekilde değerlendirilmiştir.

Bitkilerden örnekleme yapılırken 0 ve 4 skalasındaki bitkiler tercih edilmiştir. Ana olarak 1 adet hassas Anamur çeşidi (3 biyolojik tekrarlı), baba olarak 1 adet dayanıklı tür olan *Solanum macrocarpon* (3 biyolojik tekrarlı), 1 adet dayanıklı Anamur X *S. macrocarpon* F1 melezi, 1 adet dayanıklı Anamur X *S. macrocarpon* F2, 1 adet hassas Anamur X *S. macrocarpon* F2 bitkisinin yaprakları RNA izolasyonu için toplanmış, RNA izolasyonuna kadar -80 °C koşullarında saklanmıştır.



Şekil 4.10. İnokulasyondan sonra hastalık belirtilerinin başladığı dönemde viyollerdeki Anamur X *S. macrocarpon* F2 bitkilerine ait görüntüler.

4.2.10. DAYANIKLI - HASSAS F2, 1 ADET DAYANIKLI F1, ANA - BABA BİTKİ KÖKLERİNDEN RNA İZOLASYONU

İnokulasyonu gerçekleştirilen bitkilerden fungusun kök boğazında etkisinin görüldüğü dönemde tek zaman aralığında; inokulasyondan yaklaşık 3 - 4 hafta sonra yapraklardan örnekleme yapılmıştır. İnokulasyon sonrasında mevcut literatür bilgisi dahilinde 3 - 4 hafta beklenilmesi planlanmıştır (137, 141). Bu dönem aynı zamanda hassas bitkilerde fungusun kök boğazında etkisinin görüldüğü ve bitkinin alt kısımlarından itibaren en az 3 - 4 yaprağın solmaya başladığı dönem / dayanıklı bitkilerde ise bu gözlemlere rastlanmadığı dönemdir. Yapraktan alınan örnekler RNA izolasyonuna kadar -80 °C koşullarında muhafaza edilmiştir.

RNA izolasyonunda TRIZOL protokolü kullanılmıştır.

TRIZOL Protokolü

1. RNA izolasyonu öncesinde çalışma ortamı uygun solüsyonlarla (%70 ethanol) sterilize edilir.
2. -80 °C'den çıkarılan bitki örneği sıvı azot ve havan yardımıyla öğütülür.
3. Öğütülen örneklerden 300 - 500 mg izolasyon için ayrılır, kalan örnekler 1.5 ml eppendorf tüplere konularak -80 °C'de tekrar muhafaza edilir.
4. 2 ml'lik tüplere 1 ml trizol eklenir.
5. Trizolün üzerine 300 - 500 mg örnek eklenir.

6. Tüp el ile kuvvetli bir şekilde sallanarak homojen olarak karışması sağlanır, daha sonra 5 dakika vortekslenir.
7. Örnekler oda sıcaklığında 10 dk bekletilir.
8. 10 dk bekletildikten sonra tüpe 250 µl kloroform eklenir, vortekslenir.
9. Örnekler oda sıcaklığında 10 dk bekletilir.
10. 14.000 rpm'de soğutmalı santrifüjde +4 °C'de 10 dakika santrifüj edilir.
11. Santrifüj sonrasında tüpte üstte kalan süpernatant yeni tüpe aktarılır.
12. Yeni tüpe alınan örnekler 250 µl 1.2 M, 250 µl 0.8 M Na-citrate, 250 µl isopropanol eklenir.
13. Tüp el ile hafifçe alt üst yapılarak sıvıların karışması sağlanır.
14. Örnekler -20 °C'de 10 saat bekletilir.
15. Ertesi gün -20 °C'de 10 saat bekletilen örnekler, 14.000 rpm' de +4 °C'ye ayarlı soğutmalı santrifüjde 10 dakika santrifüj edilir.
16. Santrifüj sonrasında tüpün dibinde görünür halde olan pellet elde edilir. Bu aşamada; pelletin üstündeki sıvı dikkatlice uzaklaştırılır. Pellet %70'lik ETOH ile yıkanır ve dikkatlice kurutulur.
17. Pelletin yaklaşık 50 - 60 µl DNase – RNase free suda çözünmesi sağlanır.
18. Çözdürülen RNA'ların gerekli ölçümleri buz üstünde yapıldıktan sonra, RNA dizilemeye gönderilinceye kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

4.2.11. İZOLE EDİLEN RNA'LARIN MİKTAR - KALİTE KONTROL ÖLÇÜMLERİNİN YAPILMASI

Trizol yöntemi ile izole edilen RNA örnekleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir. Agaroz jele 3 µl örnek yüklenerek 80 voltta 45 dakika yürütüldükten sonra görüntülenmiştir. Agaroz jel elektroforezinde Buffer olarak 1 X TBE Buffer (Tris-borate-EDTA) kullanılmıştır. Ayrıca RNA'ların kalite ve miktar tayinleri için spektrofotometrik ölçümleri ND-1000 Nanodrop cihazında gerçekleştirilmiştir. Ölçümlerde RNA

miktarlarının 70 ng/μl'nin üzerinde (toplam 50 μl hacim) olması beklenirken, saflık olarak ise 260/280 oranının 1.8-2.0 olmasına, 260/230 değerinin 2.0'a yakın olmasına dikkat edilmiştir.

Yapılan bu ölçümler dışında hizmet alımı ile yapılan bioanalyzer ölçümleri de (RIN değeri) baz alınmıştır. RIN (RNA Integrity Number / RNA bütünlük değeri), RNA'nın bütünlüğü, gen ekspresyon çalışmaları için oldukça önemlidir. RIN algoritması jel elektroforezi kullanarak RNA bütünlüğü hakkında geniş bilgi sağlamaktadır. Tekrarlanabilir olması RIN algoritmasının önemli avantajlarından. Ölçümler 1 ile 10 arasında numaralandırılmaktadır. 10 değeri en saf RNA'yı temsil etmektedir. Sekanslamaya girecek örneklerde RIN değerinin 7 ve üzeri olması beklenmektedir. RIN değeri 7'den düşük olduğunda sekans sonuçları olumsuz etkilenebilir, hatalı sonuçlar çıkabilmektedir. RNA dizileme öncesi her bir RNA'ya ait RIN değerleri elde edilmiştir.

4.2.12. RNA DİZİLEME (RNA-SEQ = RNA SEQUENCİNG)

RNA dizileme deneme dizaynı:

RNA dizileme Anamur, *S. macrocarpon* ve Anamur X *S. macrocarpon* (Anamur X *S. macrocarpon*: Anamur X *S. macrocarpon*) F1 ve F2 melezlerinde aşağıda verilen deneme desenine göre gerçekleştirilmiştir.

1 adet hassas ve 1 adet dayanıklı F2 bitkisinde (Anamur X *S. macrocarpon*),

F2'nin geliştirildiği 1 adet dayanıklı F1 bitkisinde (Anamur X *S. macrocarpon*)

F1 bitkisinin geliştirildiği 1 adet ana bitkide (3 biyolojik tekrarlı) (*S. melongena*, Anamur F4)

F1 bitkisinin geliştirildiği 1 adet baba bitkide (3 biyolojik tekrarlı) (*S. macrocarpon*)

RNA-Seq analizlerinde, 9 adet örneğin her birinde 20 milyon okuma yapılmış olup, 20 milyon okuma x 150 baz (okuma uzunluğu) x 2 (çift yönlü okuma) olmak üzere yaklaşık 230 milyon baz ham data (raw data) okuma verisi elde edilmiştir.

Ana, baba, F1, dayanıklı - hassas F2 bitkilerinin yaprak dokularından toplam 9 örnekte RNA-Seq dizileme çalışmaları hizmet alımı yapılarak gerçekleştirilmiştir (İngiltere). RNA dizilemede kullanılan metot akışı ve biyoinformatik analizler kısaca aşağıda verilmiştir:

4.2.12.1. Transkriptom Dizileme İçin Kütüphane Hazırlığı

Total RNA izolasyonundan sonra, RNA'nın gerekli miktar - kalite ölçümleri yapıldıktan sonraki aşama kütüphane hazırlamadır. Kütüphane hazırlama öncelikle total RNA'dan rRNA'nın uzaklaştırılmasıyla elde edilen mRNA'nın cDNA'ya ters transkripsiyonu, cDNA'ların uygun primerler ile çoğaltılması ve uygun dizileme adaptörlerine bağlanması aşamalarından oluşur. Adaptörler amplifikasyon ve sekanslamada gereklidir.

Numune başına yeterli miktarda total RNA örneği kullanılmıştır. Sekans kütüphaneleri 'Illumina - NEB-Next Ultra RNA Library Prep Kit ' kullanılarak oluşturulmuştur. İndeks kodları her numuneye ait sekanslara eklenmiştir. mRNA, poly-T oligo bağlanmış manyetik boncuklar kullanılarak total RNA'dan saflaştırılmıştır. Fragmentasyon; NEB-Next Birinci İplik Sentez Reaksiyon Tamponu (5X) ile yüksek sıcaklıkta iki değerlikli katyonlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Birinci cDNA iplikçığı 'random hexamer' primer ve 'M-MuLV Reverse Transkriptaz' kullanılarak sentezlenmiştir. İkinci cDNA iplikçığı sentezi 'DNA Polymeraz I' ve 'RNase H' kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Zincir dışında kalan kısımlar ekzonükleaz / polimeraz aktiviteleri ile kör uçlara dönüştürülmüştür. DNA fragmentlerinin 3' uçlarının adenilasyonundan sonra; saç tokası yapısına sahip NEB-Next Adaptörü hibridizasyona hazırlanmak için bağlanmıştır. 250 - 300 bp uzunluğundaki cDNA fragmentlerini seçmek için, kütüphane fragmentleri 'AMPure XP' sistemi ile temizlenmiştir. Daha sonra 3 µl 'USER' enzimi, boyutlarına göre seçilmiş; adaptör takılmış cDNA ile 37°C'de 15 dakika ardından 95 °C'de 5 dakika muamele edilmiştir. Daha sonra 'Phusion High- Fidelity DNA Polymerase' enzimiyle evrensel PZR primerleri ve 'Index (X) primerleri kullanılarak PZR gerçekleştirilmiştir. Son olarak PZR ürünleri 'AMPure XP' ile temizlenmiş ve kütüphane kalitesi 'Agilent Bioanalyzer 2100' sisteminde belirlenmiştir.

4.2.12.2. Kümeleme ve Sekanslama

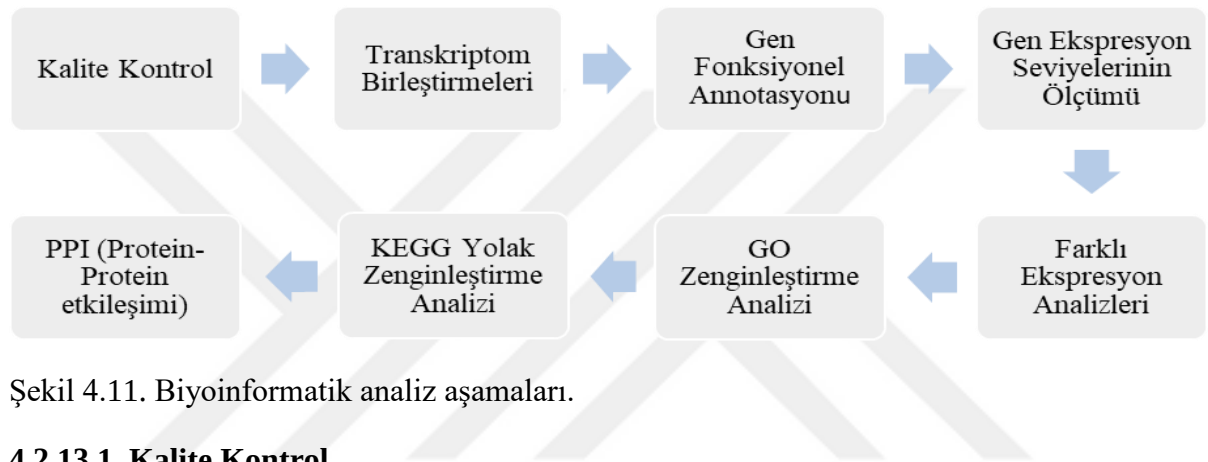
İndex kodu eklenen örneklerin kümelenmesi; 'PE Cluster Kit cBot-HS (Illumina) kullanılarak 'cBot Cluster Generation' sistemi üzerinden gerçekleştirilmiştir. Küme

oluşturma işleminden sonra; kütüphane hazırlıkları Illumina Novaseq 6000 platformunda dizilenmiş ve çift uçlu okumalardan RNA-seq dizileri üretilmiştir.

Illumina 2 farklı boya ile işaretli 4 farklı dinükleotit kullanarak sekanslama yapmaktadır. Her döngüde uygun nükleotit bağlandığında floresans kamera ile o kümenin fotoğrafı kaydedilmektedir. Görseller birleştirilerek nükleotid dizileri ortaya çıkarılmaktadır.

4.2.13. BİYOİNFORMATİK ANALİZLER

Biyoinformatik analizler şema halinde Şekil 4.10.'da verilmiştir.



Şekil 4.11. Biyoinformatik analiz aşamaları.

4.2.13.1. Kalite Kontrol

Kalite kontrol işlemleri, ham fastq formatındaki verilerin incelenerek dizileme çalışmasının etkinliğini ölçmede kullanılmaktadır. Böylelikle, çalışmada yaşanan herhangi bir sorun ve olası sebepleri hakkında bilgi edinilmiş olur. Bu aşamada, fastq formatındaki ham verilerin işlenmesi amaçlı adaptör içeren okumalar, poly-N içeren okumalar ve ham verilerden düşük kaliteli okumalar kaldırılarak, kalite kontrol analizi - trimming işlemi gerçekleştirilmiştir. Kalite kontrol analiz işlemi ile filtreleme sonrasında, temiz okuma sayısı (baz) ile bu okumalara ait Q20 (Minimum Q20 kalite skoruna sahip okumaların oranı), Q30 (Minimum Q30 kalite skoruna sahip okumaların oranı, GC (% Guanin - sitozin oranı) içeriği ve sekans duplikasyon seviyeleri hesaplanmıştır. Kalite kontrol sonrasında elde edilen veriler transkriptom birleştirmesinde kullanılmıştır.

4.2.13.2. Transkriptom Birleştirmeleri

Tüm kütüphanelerden / örneklerden gelen dosyalar tek bir büyük right.fq dosyasında havuzlanmıştır. Transkriptom birleştirmeleri Trinity programı kullanarak gerçekleştirilmiştir (142). Birleştirme işlemi sonrasında; Tüm trinity transkriptleri,

Maksimum / minumum ve ortalama contig uzunluğu ve Total trinity genleri gibi parametrelere ait veriler elde edilmiştir.

RNA-seq datasının karşılaştırılmasında kontrol ile stres örneklerine ait okumalardan oluşturulan transkriptom verisi kullanılmıştır.

4.2.13.3. Gen Fonksiyonel Anotasyonu

Gen fonksiyonları; Nr (NCBI protein verisi), Nt (NCBI nükleotid verisi), Pfam (Protein ailesi: En geniş kapsamlı domain ve ailelerinin belirlenmesinde kullanılır), KOG/COG (Ortolog protein grupların kümelenmesi), Swiss-Prot (Protein dizisi veritabanı: Protein yapı domaininin belirlenmesine yönelik, yüksek kalitede protein veritabanıdır), KO (KEGG Ortolog Veritabanı: Biyolojik yolakların analizine yönelik veri tabanıdır) ve GO (Gen Ontoloji: Genlerin fonksiyonel analizlerini belirlemek amacı ile kullanılmaktadır. Biyolojik, Moleküler ve Hücresel Komponentler olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır) veri tabanlarına göre belirlenmiştir.

4.2.13.4. Gen Ekspresyon Seviyelerinin lm

Gen ekspresyon seviyeleri her örnek için RSEM programı ile hesaplanmıştır (143). Bu aşamada: 1- Temiz veriler, birleştirilmiş transkriptom ile eşleştirilmiş, 2- Her gen için okuma sayısı haritalama sonuçlarından elde edilmiştir.

Ayrıca, stres örneğinden elde edilen veriler kontrol örneğinden elde edilen veriler ile karşılaştırılarak yapılacak olan ifade farklılığı analizinde 2 kattan daha az ifade seviyesine sahip olanlar down regüle, 2 kattan daha fazla ifade seviyesine sahip olanlar up regüle olarak değerlendirilmiştir.

4.2.13.5. Farklı Ekspresyon Analizi (DEG: differentially expressed gene)

RNA-Seq analizlerinde diferansiyel olarak ifade edilen genlerin (DEG: differentially expressed gene) belirlenmesinde kullanılan edgeR programı biyolojik tekrarlar içermeyen RNA-seq rneklerinin DEG analizinde, DESeq (DESeq R/Bioconductor package (1.10.1)) programı ise biyolojik tekrar içeren RNA-Seq rneklerinin DEG analizinde kullanılmaktadır.

Farklı gen ekspresyon analizinden önce; sekanslanan her kütüphane için; okuma sayıları bir leklendirmeli normalleştirilmiş faktör aracılı edgeR program paketi ile ayarlanmıştır.

2 örneğin farklı ekspresyon analizi, DESeq R paketi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. p değeri q değeri kullanılarak ayarlanmıştır (144). q değeri $< 0,005$ & $[\log_2 (\text{fold change})] > 1$ farklı ekspresyon değerleri için eşik değer olarak ayarlanmıştır.

4.2.13.6. GO (Gen Ontolojisi) Zenginleştirme Analizi

Ana, baba, dayanıklı F1, hassas - dayanıklı F2 bitki dokularından farklı seviyede ifade edilen genlerin (DEGs) Gen ontolojisi zenginleştirme analizi; GOseq R paket programı ile gerçekleştirilmiştir (145). Gen ontolojisi moleküler düzeyde gerçekleşen moleküler fonksiyonları, biyolojik hedefleri ve hücresel bileşenlerin sınıflandırılmasında kullanılmaktadır.

4.2.13.7. KEGG Yolak Zenginleştirme Analizi

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) hücre, organizma, ekosistem gibi biyolojik sistemlerin üst düzey işlevlerini anlamak için bir veri tabanı kaynağıdır (146). Veri tabanında; moleküler düzey bilgilerden, özellikle genom dizileme ve diğer yüksek verimli deneysel teknolojiler tarafından oluşturulan büyük ölçekli moleküler veri kümelerinden yararlanılır. KEGG yolaklarında farklı ifade edilmiş genlerin istatistiksel zenginliğini test etmek için KOBAS yazılımı kullanılmıştır (147).

4.2.13.8. PPI (Protein-protein etkileşimi)

Farklı seviyede ifade edilen genlerin (DEG) sekans dizileri, bu genlerin protein - protein etkileşimini tahmin edebilmek için ilgili bir başka türün genomuyla karşılaştırılmıştır (blastx). Sonrasında bu genlerin protein - protein etkileşimleri Cytoscape programında görselleştirilmiştir (148).

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. DTG (DAYANIKLI TÜRE AİT GENOTİP) VE HYÇ (HASSAS YERLİ ÇEŞİT) BİTKİLERİNİN MELEZLENMESİ

Hassas Yerli Çeşit (HYÇ) ve Dayanıklı Türe ait genotipler (DTG) uygun koşullarda melezlenmiştir. Bu melezlemelerde yapılan melezleme sayısı, melezlemeler sonucunda elde edilen meyve ve tohum sayıları Çizelge 5.1.'de verilmiştir.

Çizelge 5.1. Çalışmada kullanılan HYÇ ve DTG melezleme kombinasyonları, yapılan melezleme sayıları, meyve tutum oranı, elde edilen tohum sayıları.

HYÇ X DTG Melezleme Kombinasyonları	Yapılan Melezleme Sayısı	Meyve Tutum Oranı	Elde edilen Tohum Sayısı
Anamur F2 X <i>S. insanum</i> (60)	5	2	57
Anamur F2 X <i>S. aethiopicum Gilo</i>	5	1	45
Anamur F2 X <i>acelatum</i>	5	1	28
Anamur F2 X <i>S. integrifolium</i>	5	2	120
Anamur F2 X <i>S. linneanum</i> (37)	5	1	6
Anamur F2 X T22AÇ	5	1	5
Anamur F2 X <i>S. incanum</i> (21)	5	2	352
Anamur F4 X <i>S. macrocarpon</i>	5	2	482
Anamur F4 X <i>S. incanum</i>	5	2	171
Anamur F4 X <i>S. linneanum</i> (33)	5	1	1
Anamur F4 X <i>S. anguivi</i> (29)	5	2	214
Anamur F4 X <i>S. sisymbriifolium</i>	5	1	-
Anamur F4 X <i>acelatum</i> (11)	5	1	-
Anamur F4 X T22AÇ	5	4	296
Yamula X <i>S. incanum</i>	5	1	3
Yamula X <i>S. linneanum</i> (37)	5	1	20
Yamula X <i>S. insanum</i> (60)	5	1	65
Pala X <i>S. linneanum</i> (37)	5	2	60
Pala X <i>S. aethiopicum Gilo</i>	5	1	119
Pala X <i>S. linneanum</i> (10)	5	1	205

5.2. İZOLE EDİLEN RNA'LARIN KALİTE VE MİKTAR ÖLÇÜM DEĞERLERİ

3 adet hassas yerli çeşit, 3 adet dayanıklı türe ait genotip 1 adet dayanıklı F1 ve 1 adet dayanıklı 1 adet hassas F2 bitkisinin yapraklarında izole edilmiş RNA'ların ND-1000 cihazındaki spektrofotometrik ölçümleri Çizelge 5.2.'de verilmiştir.

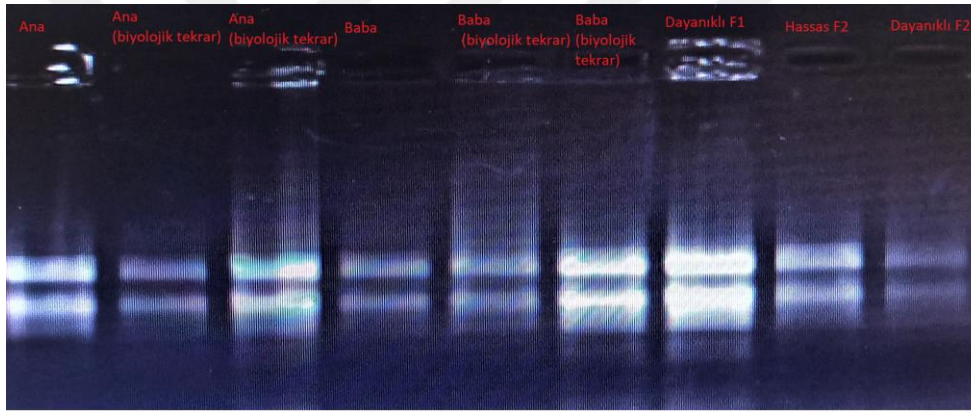
Çizelge 5.2. İzole edilen RNA'lara ait kalite ve miktar ölçümleri.

Örnek Adı	260/280	260/230	ng/µl
Ana	2.2	1.7	971
Ana (biyolojik tekrar -1)	2.16	1.3	1408
Ana (biyolojik tekrar -2)	2.2	1.52	1743
Baba	2.2	1.2	263.48
Baba (biyolojik tekrar -1)	2.16	1.15	135.52
Baba (biyolojik tekrar -2)	2.15	1.2	115.5
Daynıklı F1	2.16	1.2	564.60
Hassas F2	1.89	1.1	138.53
Dayanıklı F2	2.16	1.15	395.11

Elde edilen nükleik asit değerleri yeterli miktar ve temizlikte bulunmuştur.

5.3. İZOLE EDİLEN RNA'LARA AİT JEL GÖRÜNTÜSÜ

İzole edilen 9 adet RNA örneği %1'lik agaroz jelde 45 dakika 90 voltta yürütülmüştür. 45 dakika sonrasında jel görüntüleme cihazındaki görüntü Şekil 5.1.'de verilmiştir.



Şekil 5.1. 9 adet RNA'ya ait agaroz jel görüntüsü.

Jel görüntüleri spektrofotometre ölçümlerini doğrular şekilde sonuçlar vermiştir. Elde edilen RNA bantlarında herhangi bir degradasyon vs. görülmemiştir. Bitkilerde görülen 28S ve 18S ribozom alt üniteleri jelde gözlemlenmiştir.

5.4. İZOLE EDİLEN RNA'LARA AİT RIN (RNA INTEGRITY NUMBER / RNA BÜTÜNLÜK DEĞERİ) DEĞERLERİ

RNA'lar Nanodrop ve agaroz jeldeki kontrollerinin ardından uygun koşullarda muhafaza edilerek RNA sekanslama için hizmet alımının gerçekleştirileceği yere gönderilmiştir. RNA'lar sekanslanmadan önce 2100 Bioanalyzer (Agilent) ölçümleri ile RIN değerleri belirlenmiştir. 9 adet RNA örneğine ait RIN değerleri Çizelge 5.3.'de verilmiştir.

Çizelge 5.3. RNA örneklerine ait RIN değerleri.

Örnek Adı	RIN Değeri
Ana	7.2
Ana (biyolojik tekrar)	7.0
Ana (biyolojik tekrar)	7.1
Baba	7.1
Baba (biyolojik tekrar)	7.2
Baba (biyolojik tekrar)	8.7
Dayanıklı F1	7
Hassas F2	7.1
Dayanıklı F2	7.7

5.5. RNA DİZİLEME VERİLERİNDE YAPILAN ANALİZLER

RNA dizilemeleri gerçekleştirilen toplam 9 adet örnekte aşağıda verilen analizler gerçekleştirilmiştir.

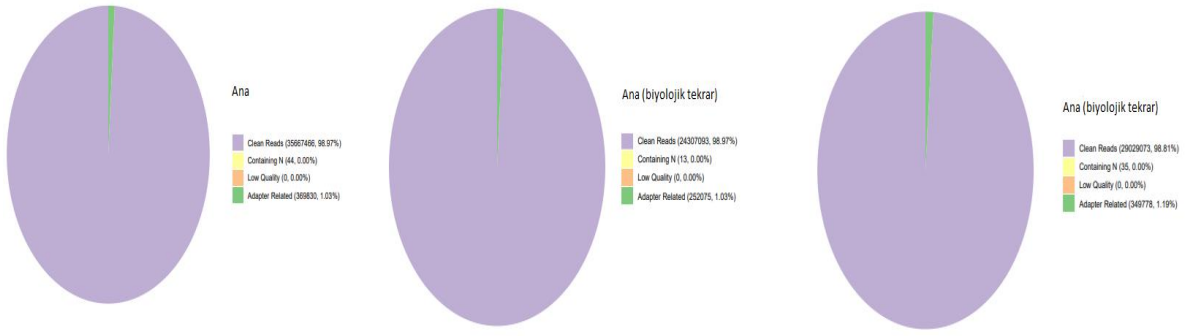
5.5.1. Ham Veri ve Net Veri

Örneklere ait dizi okumaları FASTQ formatına dönüştürülmüştür. Ham veride, hata oranı her bir baz için $Q_{phred} = -10\log_{10}(e)$ formülü ile belirlenmiştir. Baz kalitesi ve Phred skor ilişkisi CASAVA v1.8 yazılımı ile hesaplanmıştır (Çizelge 5.4.).

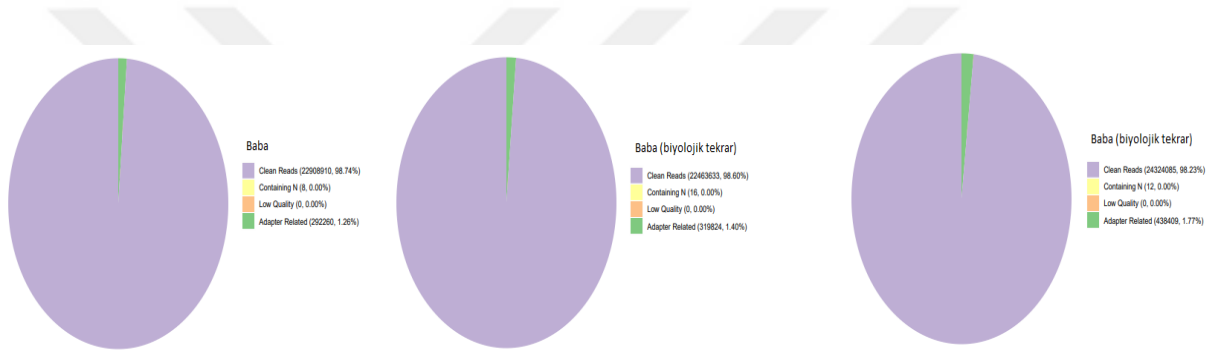
Çizelge 5.4. Değişik Phred ve Q skorlarına göre hatalı baz/doğru okuma oranları.

Phred Skor	Hatalı Baz Oranı	Doğru Okuma Oranı	Q Skoru
10	1/10	%90	Q10
20	1/100	%99	Q20
30	1/1000	%99.9	Q30
40	1/10000	%99.99	Q40

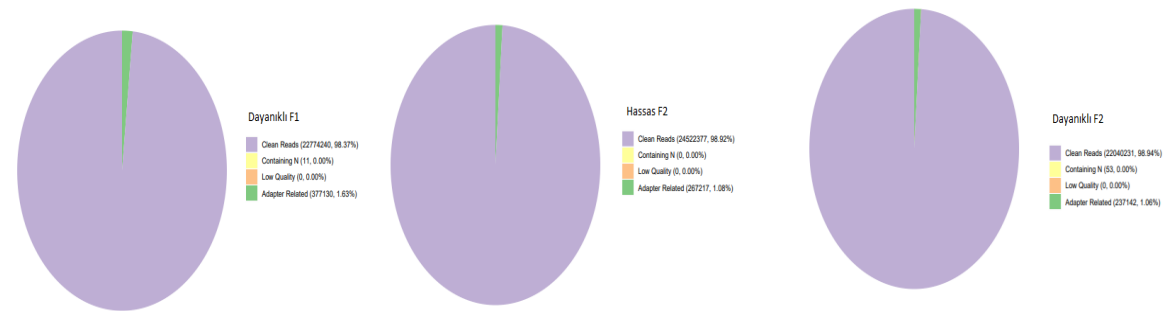
Ham okumada gerekli kalite kontrollerin yapılmasının ardından; adaptör verilerinin, düşük veri okumalarının uzaklaştırılmasıyla sonuç olarak kullanılacak net verilere ulaşılmıştır. Ana, Ana (biyolojik tekrar), Ana (biyolojik tekrar), Baba, baba (biyolojik tekrar), Baba (biyolojik tekrar), Dayanıklı F1, Hassas F2, Dayanıklı F2 örneklerine ait ham veri - temizlenmiş sonuç verisinin oranları Şekil 5.2. , 5.3. , 5.4.'de verilmiştir.



Şekil 5.2. Ana, Ana (biyolojik tekrar), Ana (biyolojik tekrar) örneklerinde ham veriye uygulanan veri kalite sonuçları (N: veride bilinmeyen %10'dan fazla nükleotid bulunması, Düşük kalite (low quality): okunan dizide %50 oranından (baz kalitesinin 20'den az olması) az kaliteli okuma bulunması).



Şekil 5.3. Baba, Baba (biyolojik tekrar), Baba (biyolojik tekrar) örneklerinde ham veriye uygulanan veri kalite sonuçları (N: veride bilinmeyen %10'dan fazla nükleotid bulunması, Düşük kalite (low quality): okunan dizide %50 oranından (baz kalitesinin 20'den az olması) az kaliteli okuma bulunması).



Şekil 5.4. Dayanıklı F1, Hassas F2, Dayanıklı F2 örneklerinde ham veriye uygulanan veri kalite sonuçları (N: veride bilinmeyen %10'dan fazla nükleotid bulunması, Düşük kalite (low quality): okunan dizide %50 oranından (baz kalitesinin 20'den az olması) az kaliteli okuma bulunması).

RNA dizilemelerinde hatalı okumaların farklı sebepleri vardır. Dizileme kimyasallarının optimum oranda kullanılmaması, cDNA sentezi sırasında kullanılan random hexamer

primerleri dizilemelerde hata oranını arttırmaktadır (149). Bu hataları elemine etmek amacı ile ham veri okumalarından net veriler belirlenmektedir. RNA dizilemesi yapılan 9 örneğin baz okumaları ve kalite kontrollerinden sonra elde edilen kullanılabilir net veriler Çizelge 5.5.'de verilmiştir.

Ham veri ve net veri okumaları en yüksek olarak Ana ve Ana (biyolojik tekrar) örneklerinde tespit edilmiştir. GC içeriği en yüksek gen dizileri Ana ve Ana (biyolojik tekrar) örnekleri iken en düşük GC oranı Dayanıklı F1 ve Hassas F2 örneklerinde tespit edilmiştir. 9 örneğe ait dizileme hata oranı da %3 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 5.5.).

Çizelge 5.5. Örnekler bazında elde edilen ham ve kullanılabilir net veri sonuçları

Örnek adı	Ham veri	Net veri	Hata (%)	Q20 (%)	Q30 (%)	GC (%)
Ana	36037340	35667466	3	97.42	92.72	43.18
Ana (biyolojik tekrar)	24559181	24307093	3	97.70	93.33	43.43
Ana (biyolojik tekrar)	29378886	29029073	3	97.28	92.36	41.76
Baba	23201178	22908910	3	97.79	93.65	41.58
Baba (biyolojik tekrar)	22783473	22463633	3	97.90	93.95	42.15
Baba (biyolojik tekrar)	24762506	24324085	3	97.78	93.61	41.94
Dayanıklı F1	23151381	22774240	3	97.85	93.80	40.90
Hassas F2	24789594	24522377	3	97.87	93.68	41.00
Dayanıklı F2	22277426	22040231	3	97.88	93.75	41.75

5.5.2. Transkriptom Birleştirilmesi ve Dağılımı

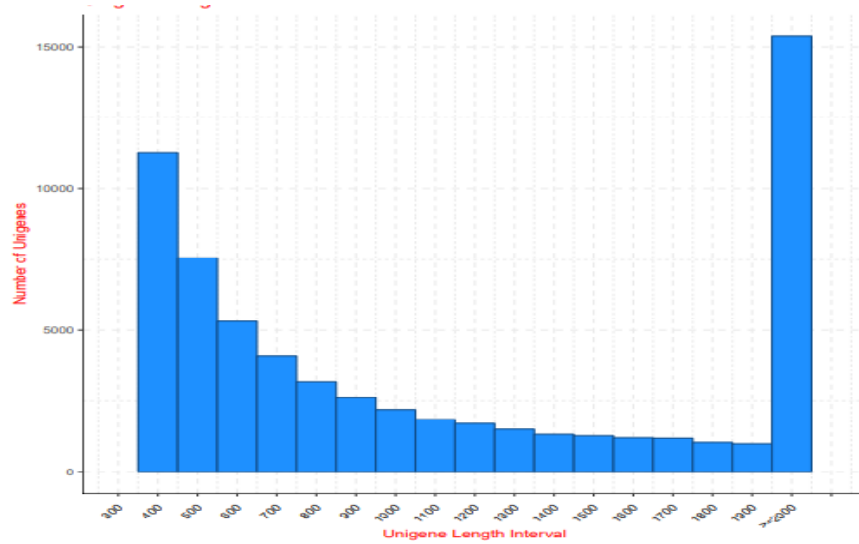
9 adet RNA dizileme örneğinin herbirisinden elde edilen transkriptom verileri (kullanılabilir / net veri) Trinity programı ile birleştirilmiş, sonrasında fazlalık oluşturan transkriptler uzaklaştırılmıştır (142). Transkriptlerin en uzun olanları unigene olarak isimlendirilmiştir. Toplam transkript sayısı 205.445 iken; toplam unigene sayısı 70.195 olarak hesaplanmıştır. 9 adet RNA dizilemesinden elde edilen Unigene / transkript uzunluk dağılımları ve sayıları Çizelge 5.6. ve Şekil 5.5., 5.6., 5.7.'de verilmiştir.

Çizelge 5.6. Transkript ve unigene'lerin uzunluk dağılımları ve sayıları.

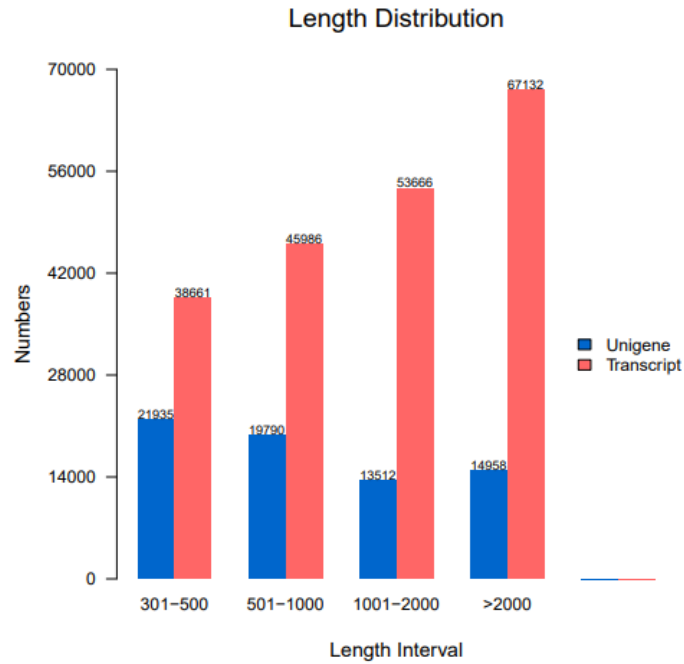
Transkript uzunluk aralıkları	300-500 bp	500-1kbp	1k-2 kbp	>2kbp	Toplam
Transkript sayısı	38.661	45.986	53.666	67.132	205.445
Unigene sayısı	21.935	19.790	13.512	14.958	70.195

bp: baz çifti, kbp: kilobazçifti

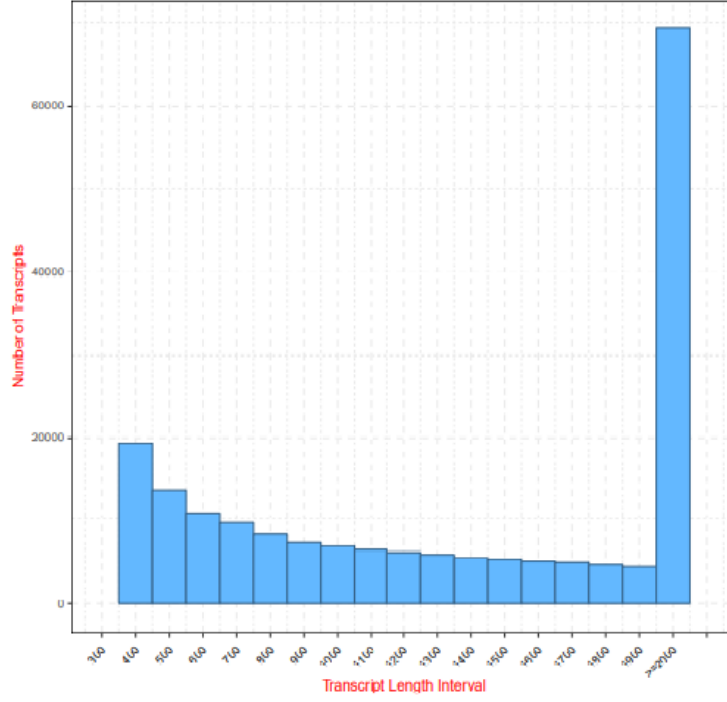
Çizelge 5.6. ve Şekil 5.5., Şekil 5.6., Şekil 5.7.'ye bakıldığında, transkript ve unigene sayılarının birbirine paralellik gösterdiği görülmektedir.



Şekil 5.5. Unigene uzunluk dağılımları ve sayıları.



Şekil 5.6. Unigene/transkript uzunluk dağılımları ve sayıları.



Şekil 5.7. Transkript uzunluk dağılımları ve sayıları.

5.6. RNA Dizilemelerinde Genlerin Fonksiyonel Analizi

RNA dizilemeleri sonucunda detaylı gen anotasyonlarının gerçekleştirilmesi için 7 farklı veri tabanına karşı anotasyonlar gerçekleştirilmiştir. Bu veri tabanları:

1-Nr (NCBI non-redundant protein sequences): GenBank, PDB (Protein Data Bank), SwissProt, PIR (Protein Information Resource), PRF (Protein Research Foundation) vb. protein dizilerini içermektedir.

2-Nt (NCBI nucleotide sequences): NCBI nükleotid veri bankasıdır. GenBank, EMBL and DDBJ'yi içermektedir.

3-Pfam (Protein family): En geniş kapsamlı domain ve ailelerini içermektedir.

4-KOG/COG: COG (Cluster of Orthologous Groups of proteins) ve KOG (eukaryotic Orthologous Groups): NCBI'da yer alan gen ortologları veri tabanıdır. COG prokaryotlara KOG ise ökaryotlara özel olarak kullanılmaktadır.

5-Swiss-Prot: Protein yapı domaininin belirlenmesine yönelik, yüksek kalitede protein veri tabanıdır.

6-KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome): Biyolojik yolların analizine yönelik veri tabanıdır.

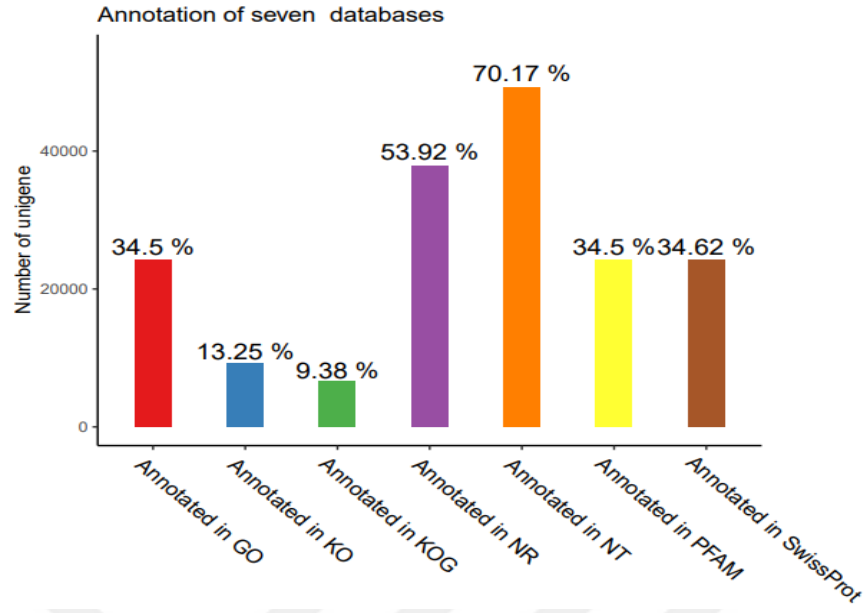
7-GO (Gene Ontology): Genlerin fonksiyonel analizlerini belirlemek amacı ile kullanılmaktadır. Biyolojik, Moleküler ve Hücresel Komponentler (Biyolojik prosess: BP, Moleküler Fonksiyon: MF ve Hücresel Komponent: CC) olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır.

Bu veri tabanlarına yönelik anotasyonların sonuçları Çizelge 5.7. ve Şekil 5.8. ve Şekil 5.9.'da verilmiştir. Anotasyon sonuçlarına göre; toplam 70.195 unigene belirlenmiştir. Unigene'lerin en az %78.62'si (55.190) bir veri tabanıyla eşleşmiştir. Tüm veri tabanlarıyla eşleşen unigene sayısı 3136 (%4.46)'dır. Unigene'lerin en fazla eşleştiği veri tabanı %70.17 (49.256) ile Nt (NCBI nucleotide sequences) veri tabanıdır (Çizelge 5.7.).

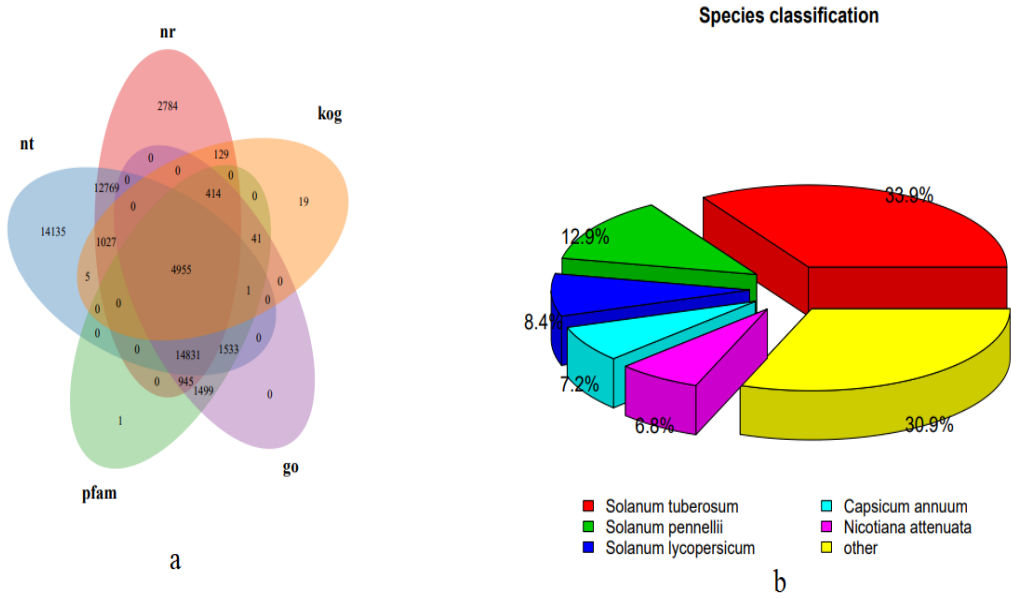
Anotasyonu yapılan verinin % oranı, çeşitliliğine ait venn diagramı ve verinin bitkisel materyallere yönelik dağılımı Şekil 5.9.'da gösterilmiştir. Anotasyonu yapılan verinin ana – baba - hibrit bitkilere göre dağılımına bakıldığında, *Solanum tuberosum* (patates), *Solanum pennellii*, *Solanum lycopersicum* (domates), *Capsicum annum* (biber), *Nicotiana attenuata* ve diğer türler ile ortologlar olduğu görülmektedir. Bunlar arasında en yüksek eşleşme %33.9 ile *Solanum tuberosum* (patates) ile olmuştur (Şekil 5.9.).

Çizelge 5.7. Veri tabanlarına yönelik unigene sayıları.

Anotasyon yapılan veri tabanı adı	Unigene sayısı	(%)
NR	37854	53.92
NT	49256	70.17
KO	9306	13.25
SwissProt	24302	34.62
PFAM	24220	34.5
GO	24219	34.5
KOG	6591	9.38
Tüm veri tabanlarına	3136	4.46
En az bir veri tabanına	55190	78.62
Toplam Unigene	70195	100



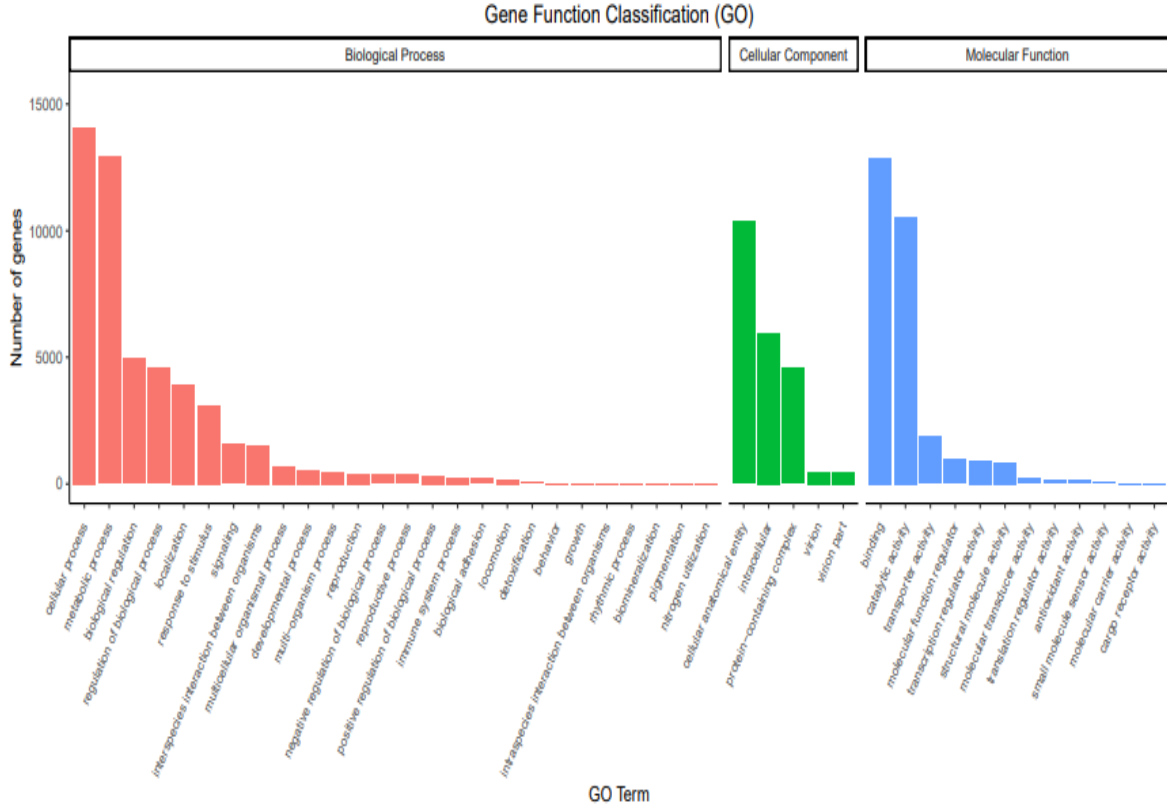
Şekil 5.8. Veri tabanlarına yönelik anotasyon dağılımları.



Şekil 5.9. a) Anotasyonu yapılan verinin sayısının değişik veri tabanlarına göre venn diagram dağılımı, b) Anotasyonu yapılan verinin değişik organizmalara yönelik benzerlik dağılımı.

9 adet örneğe ait farklı düzeyde ifade olan genler; Biyolojik hedefler (BP), Hücresel bileşenler (CC), Moleküler fonksiyonlarına (MF) göre temelde 3 ana gruba ayrılmışlardır. Biyolojik hedefler (BP) 26, Hücresel bileşenler (CC) 5, Moleküler fonksiyon (MF) ise kendi arasında 12 olmak üzere genler toplamda 43 alt grupta toplanmıştır (Şekil 5.10.).

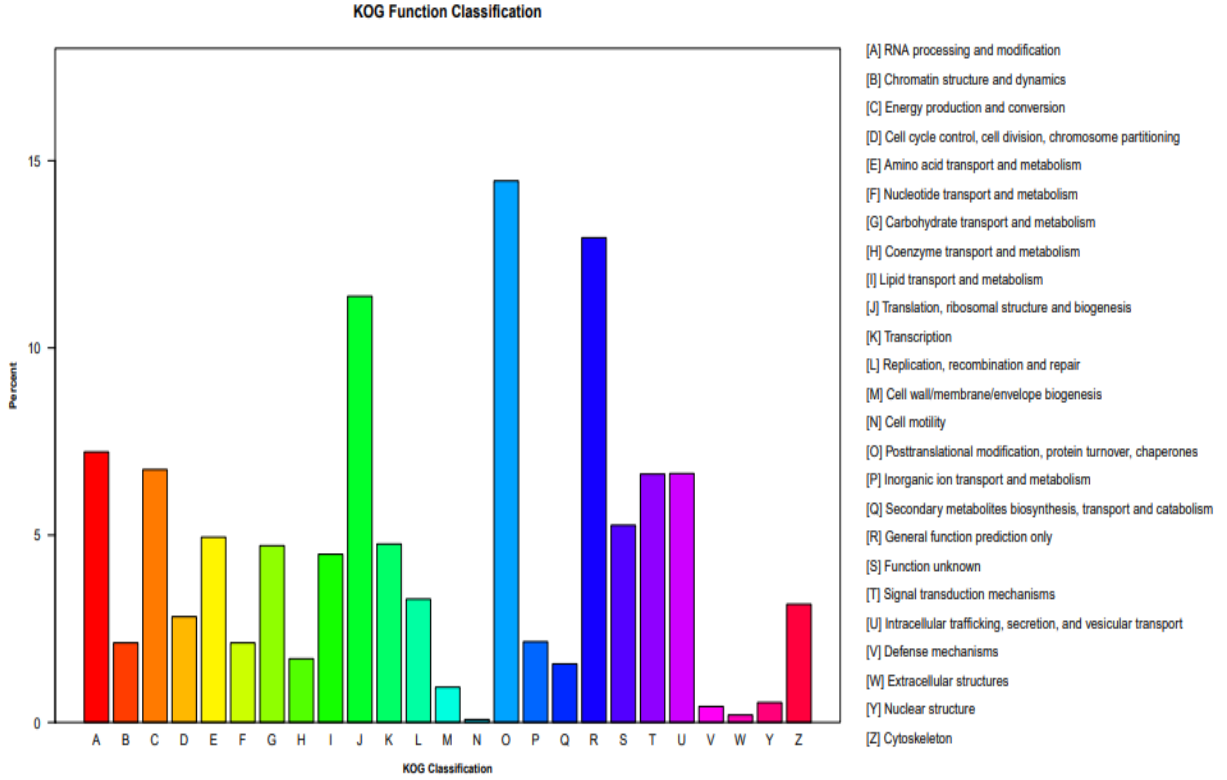
Dizileme sonuçlarından elde edilen gen ontoloji anotasyonuna göre, biyolojik hedefler grubunda hücresel süreç ve metabolik süreçle ilgili genler, hücresel bileşenler grubunda hücresel anatomik varlığa ait genler, moleküler fonksiyonlar grubunda ise bağlayıcı ve katalitik aktivite genler en yüksek orandadır (Şekil 5.10.).



Şekil 5.10. Gen ontoloji anotasyonu.

KOG (EuKaryotic Orthologous Groups) veritabanı 7 ökaryotik genoma ait proteinleri içermektedir. Bunlar; *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster* (meyve sineği), *Caenorhabditis elegans* (nematod), *Arabidopsis thaliana*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* ve hücre içi parazit olan *Encephalitozoon cuniculi*' dir. Mevcut KOG veri tabanı 59.838 protein, ökaryotik 110.655 genin %54'ünü içeren 4852 ortologdan oluşmaktadır.

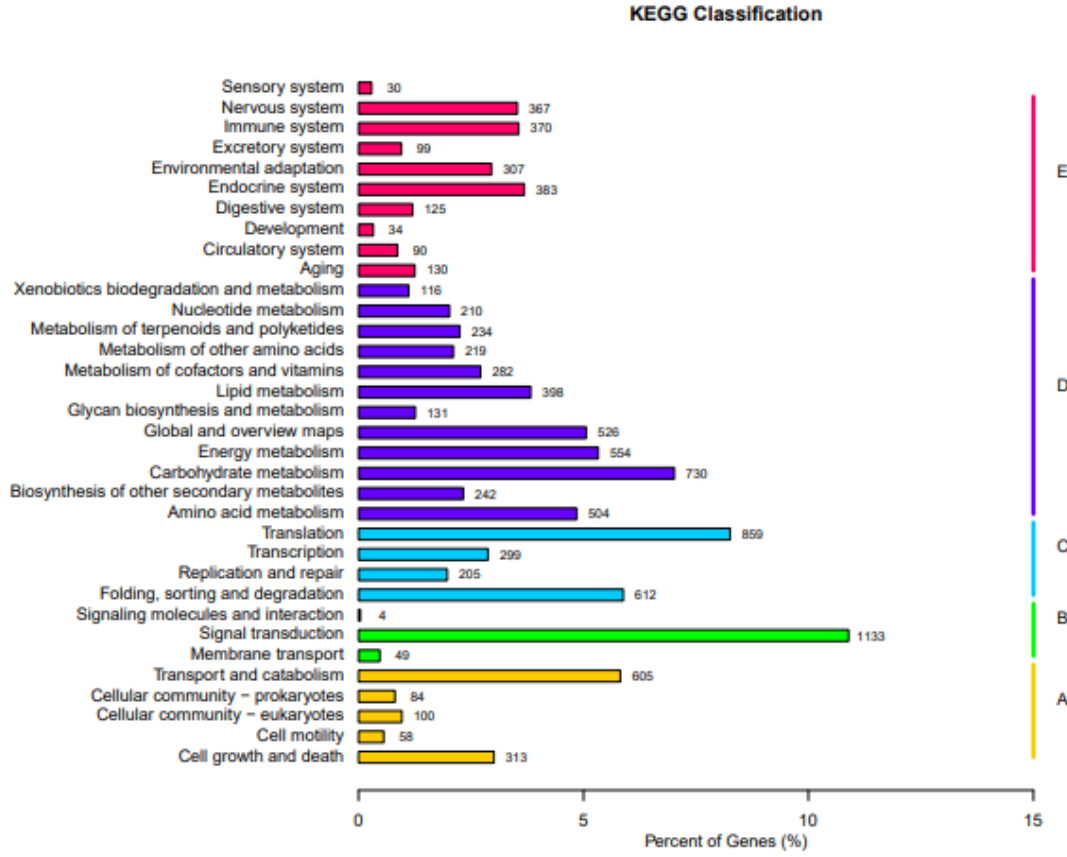
Dizileme sonuçlarının KOG veritabanına anote edilen genlerin sınıflandırılmasında en yüksek eşleşme; posttranslasyonel modifikasyon - protein döngüsü - şaperonlar, genel fonksiyonlara ve translasyon - ribozomal yapı ve biyogeneze ait genlerde tespit edilmiştir (Şekil 5.11.).



Şekil 5.11. KOG’a anote edilen genlerin sınıflandırılması.

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) genomik ve moleküler seviyedeki bilgiyi; bu bilginin hücre - organizma ve ekosistem içerisindeki görevlerini ve biyolojik sisteme katkılarını açıklamak için kullanılan bir veritabanıdır. KEGG ayrıca metabolik yolak veri tabanları arasında en kapsamlı olanıdır (150). Sonuçlar KEGG sınıflandırmasına göre, A: Hücresel proses, B: Hücre dışı proses, C: Genetik Bilgi Prosesi, D: Metabolizma ve E: Organizmal sistem olmak üzere beş gruplandırma göstermiştir.

En yüksek yolak sayısına sahip grup metabolizma grubu iken; en düşük yolak sayısının hücre dışı proses grubuna ait olduğu görülmektedir. KEGG yolak sonuçlarına bakıldığında; en yüksek transkripsiyona sahip olan yollar sinyal iletimi, transkripsiyon, karbonhidrat metabolizması, transport ve katabolizma, enerji metabolizması yolağıdır (Şekil 5.12.).



Şekil 5.12. KEGG’e anatasyonu yapılan genlerin sınıflandırılması.

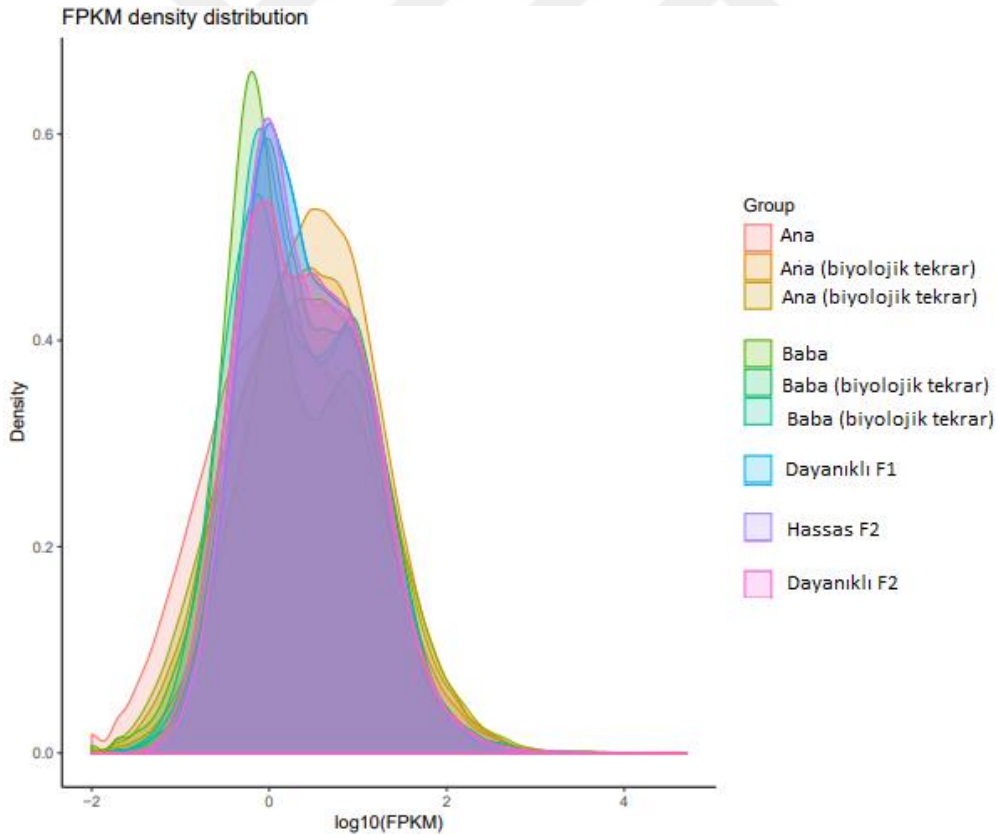
5.7. RNA Dizilemelerinde Referans Oluşturma ve İfade Analizleri

Her ne kadar kültür patlıcanının referans genomu bulunsada ebeveyn olarak kullanılan yabancı patlıcanın (*Solanum macrocarpon*) referans genomunun bulunmaması nedeni ile 9 adet dizilemeden her bir dizilemenin ayrı ayrı eşleştirileceği referans veri oluşturulmuştur. Bu amaçla de novo transkriptom okumaları Corset programı ile filtrelenerek Hierarchical Cluster oluşturularak, fazlalık oluşturan transkriptler uzaklaştırılmış ve elde edilen veri “referans” (“ref” olarak adlandırılacaktır) veri olarak elde edilmiştir (151). Herbir RNA dizilemedeki ref üzerine transkriptomların her biri RSEM programı ile tekrardan haritalanarak her bir örnek ve kontrolündeki gen ifadesi belirlenmiş ve ifade değerleri olarak bu transkriptom sayıları ve ifade değerleri esas alınmıştır (143). Referans dizi oluşturması sonucu, Çizelge 5.8.’de verilmiştir. Toplam (net) okuma temiz okuma sayısını, toplam haritalanan (%) ise referans genomla eşleşebilecek toplam okuma sayısını ifade etmektedir.

Çizelge 5.8. Toplam (net) okumalar ve ref'e tekrar haritalanması sonucu elde edilen transkriptom sayıları.

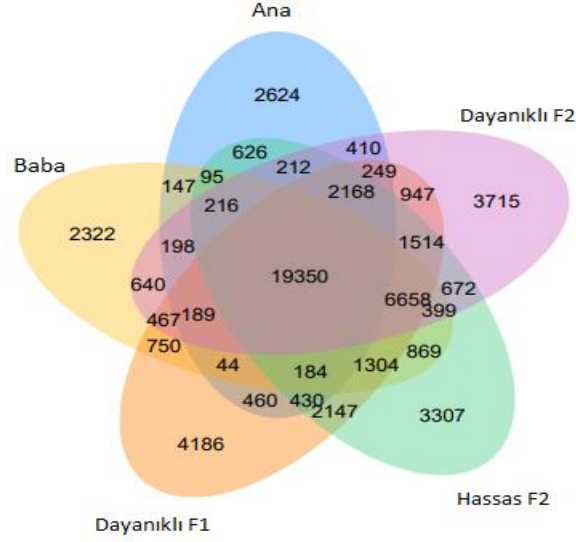
Örnek Adı	Toplam (net)okuma	Toplam Haritalanan (%)
Ana	71.334.932	55.061.132 (%77.19)
Ana (biyolojik tekrar)	48.614.186	37.411.998 (%76.96)
Ana (biyolojik tekrar)	58.058.146	44.691.764 (%76.98)
Baba	45.817.820	35.836.408 (%78.22)
Baba (biyolojik tekrar)	44.927.266	34.622.168 (%77.06)
Baba (biyolojik tekrar)	48.648.170	37.933.000 (%77.97)
Dayanıklı F1	45.548.480	35.317.924 (%77.54)
Hassas F2	49.044.754	37.731.222 (%76.93)
Dayanıklı F2	44.080.462	34.238.834 (%77.67)

Her bir örneğe ait her transkriptom ifadesinin karşılaştırılması için, değişik koşullarda ifade olan genlerin RNA dizileme çalışmalarında en yaygın kullanılan FPKM (Expected Number Of Fragments Per Kilobase of Transcript Sequence Per Millions Base Pairs Sequenced) / Milyon kilobazdaki fragment miktarı) analizlerine tabii tutulmuştur. FPKM'den ifade olan genlerin ifade seviyelerini belirlemede yararlanılmaktadır. Örneklerle ait toplu FPKM yoğunluk dağılımları (gen ifadesi seviyeleri) Şekil 5.13.'de verilmiştir.



Şekil 5.13. Örneklerle ait FPKM dağılımı.

Örneklere ait en yüksek FPKM yoğunluğu baba örneğinde görülmüştür. İfade olan genlerin RNA dizileme örneklerine göre farklı ve kesişen dağılımları ise venn diagramı olarak Şekil 5.14.'de verilmiştir.



Şekil 5.14. İfade olan genlerin RNA dizileme örneklerine göre farklı ve kesişen dağılımlarının venn diagramı.

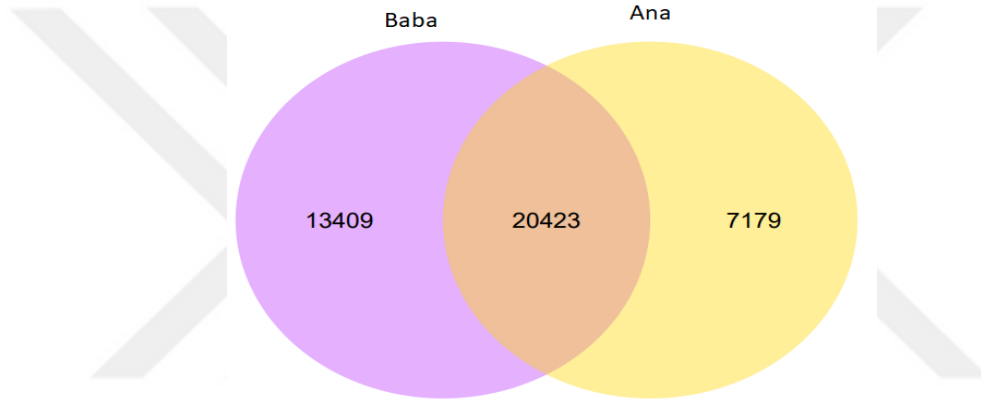
RNA dizilemelerinin sonucunda elde edilen verilere bakıldığında tüm örneklerde gen ifadesi seviyelerinde farkların olduğu görülmektedir. 9 örnekten dayanıklı olduğu bilinen Baba ile Dayanıklı F2 640 adet ortak gen, Hassas olduğu bilinen Ana ile hassas F2 örneği 622 ortak gen; Dayanıklı F1 ve Dayanıklı F2 947 ortak gen, Baba – Dayanıklı F1 – Dayanıklı F2 örneklerinde 467 ortak gen olduğu; 19.350 adet genin ise 9 örneğin tamamında ortak profil gösterdiği görülmektedir. En yüksek spesifik gen sayısı 4186 ile Dayanıklı F1’de, en düşük spesifik gen sayısı 2322 ile Baba örneğinde tespit edilmiştir (Şekil 5.12.). RNA dizilemesi yapılan örneklerin ikili olarak karşılaştırılmaları / artan – azalan gen sayıları ise Çizelge 5.9.’da verilmiştir.

Çizelge 5.9. Örnekler arasında artan – azalan genlerin karşılaştırılması.

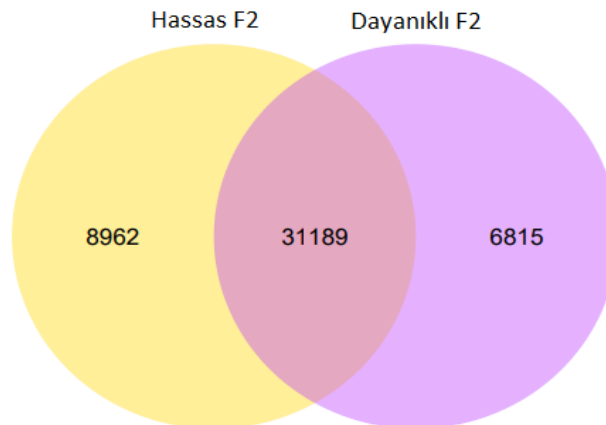
Karşılaştırılan örnekler	Toplam gen sayısı	Artan gen sayısı	Azalan gen sayısı
Ana - Baba	23643	9214	14429
Ana - Hassas F2	11335	4880	6455
Baba – Dayanıklı F1	5696	1170	4526
Baba – Dayanıklı F2	4809	182	4627
Dayanıklı F1 – Dayanıklı F2	2321	398	1923
Hassas F2 – Dayanıklı F2	3657	1018	2639

RNA dizileme analizi yapılan örneklerin ikili olarak karşılaştırma sonuçları Çizelge 5.9.’da verilmiştir. Buradaki verilere göre, hassas olduğu bilinen ana ve dayanıklı olduğu bilinen

baba örneği karşılaştırıldığında 23643 genden 9214 genin artan ifade gösterirken; 14429 genin ifadesinin azaldığı belirtilmiştir. Hassas F2 ve Dayanıklı F2 örneklerinin karşılaştırılmasında 3657 genden 1018 genin ifadesinin artarken 2639 genin azalan ifade gösterdiği belirlenmiştir. İki hassas örnek ana ve Hassas F2'nin karşılaştırılması sonucunda 4880 genin ifadesi artarken 6455 genin azalan ifade gösterdiği; iki dayanıklı örnek baba ve dayanıklı F2'nin karşılaştırılması sonucunda 182 genin ifadesi artış göstermişken 4627 gen azalan ifade göstermiştir. Dayanıklı örnekler arasında yapılan bir diğer karşılaştırma ise Baba ve Dayanıklı F1 arasında yapılmıştır. Buradaki verilere bakıldığında ise 1170 genin ifadesinin artarken; 4526 genin ifadesinin azaldığı; Dayanıklı F1, Dayanıklı F2 arasında ise 398 genin ifadesinin artarken 1923 genin ifadesinin azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 5.15. Baba ve Ana örneklerinde ifade olan genlerin kesişen dağılımlarının venn diagramı.



Şekil 5.16. Hassas F2 ve Dayanıklı F2'de ifade olan genlerin kesişen dağılımlarının venn diagramı.

9 adet örneğe ait RNA dizilemeleri sonucunda ifade olan genlere göre farklı Venn diagramları oluşturulmuştur. Bunlardan Baba ve Ana örneklerine ait venn diagramı Şekil 5.15.'de verilmiştir. Bu diagrama göre Baba ve Ana örneklerinin ortak transkript sayısı 20.423 olarak tespit edilmiştir.

RNA dizilemeleri sonucu ifade olan genlerin Hassas F2 ve Dayanıklı F2 örneklerine ait venn diagramı ise Şekil 5.16.'da verilmiştir. Bu diagrama göre Hassas F2 ve Dayanıklı F2 örneklerinin ortak transkript sayısı 31.189 olarak tespit edilmiştir.

5.8. RNA Dizilemeleri Sonucunda İfade Edilen Transkriptlerin Örnekler Arasında Karşılaştırılması

5.8.1. Ana – Baba arasındaki artan azalan genler

Dayanıklı olduğu bilinen *Solanum macrocarpon* türüne ait baba örneği ve hassas olduğu bilinen *Solanum melongena* türüne ait Anamur çeşidi'nin RNA dizilemeleri sonucunda ifadesi artan gen sayısı 9214 iken ifadesi azalan gen sayısı 14429'dur. Bu genlerden en fazla ifadesi artan ve azalan 40 adet genin tanımı ve ifade dereceleri Çizelge 5.10. ve Çizelge 5.11.'de verilmiştir.

Çizelge 5.10. Ana – baba örnekleri arasında ifadesi en çok artan 40 gene ait bilgiler.

Genin tanımı	(İfade artışı)	Genin tanımı	(İfade artışı)
Tahmini: uncharacterized protein LOC104235009	9.99	Tahmini: TMV resistance protein N-like	9.83
Tahmini: tetraspanin-7-like	9.99	Maturase K (plastid)	9.82
Agmatine hydroxycinnamoyltransferase 1-like	9.99	Protein DJ-1 homolog C isoform X5	9.82
Dehydration responsive element binding protein 1	9.98	Expansin-like B1	9.81
Cytochrome c oxidase subunit 5C	9.98	Tahmini: MATH domain and coiled-coil domain containing protein	9.80
Vacuolar-processing enzyme-like	9.97	Uncharacterized protein LOC107062863	9.79
Tahmini: calmodulin-binding transcription activator 1-like isoform X3	9.94	Protein enhanced disease resistance 2-like isoform X1	9.76
HVA22-like protein	9.94	Hypothetical protein VITISV-024041	9.75
Tahmini: uncharacterized protein LOC 107060461	9.93	Hypothetical protein BC332-02601	9.75
Tahmini: uncharacterized protein LOC 107060755	9.92	Photosystem II kDa polypeptide, chloroplastic-like	9.75
Hypothetical protein T459-30168	9.89	Hypothetical protein BC3304809	9.74
Tahmini: beta-fructofuranosidase, insoluble isoenzyme 1-like isoform X1	9.89	Tahmini: protein SRG1-like	9.73
Ethylene-responsive transcription factor 14	9.88	Hypothetical protein T459-33810	9.72
Tahmini: TMV resistance protein N-like	9.87	Tahmini: uncharacterized protein LOC107059761	9.72
Tahmini: F-box/kelch-repeat protein Atg23880-like	9.87	Hypothetical chloroplast RF21	9.72
Tahmini: uncharacterized protein LOC107062266	9.87	Tahmini: uncharacterized protein LOC107868232	9.70
Uncharacterized protein LOC111994778	9.86	Tahmini: non-specific lipid-transfer protein A-like	9.69
Tahmini: uncharacterized protein LOC107057970	9.83	Hypothetical proteinT459-20356	9.68
Bidirectional sugar transporter SWEET14-like	9.83	Tahmini: thaumatin-like protein 1	9.67
Tahmini: uncharacterized protein LOC102599371	9.83	Hypothetical protein BC332-11049	9.67

Çizelge 5.11. Ana – baba örnekleri arasında ifadesi en çok azalan 40 gene ait bilgiler.

Genin tanımı	(İfade azalışı)	Genin tanımı	(İfade azalışı)
Proteinase inhibitör type-2	9.97	Protein whats this factor 1 homolog, chloroplastic	9.78
Tahmini: uncharacterized protein LOC102603713	9.97	Tahmini: uncharacterized protein LOC102598429	9.76
Endoglucanase 17	9.93	Tahmini: uncharacterized protein LOC107057783	9.76
Tahmini: protein FAR-related sequence 3	9.92	Tahmini: uncharacterized protein LOC102580934	9.75
Tahmini: uncharacterized protein LOC104100608	9.90	Dead-box ATP-dependent RNA helicase 39	9.74
Tahmini: uncharacterized protein LOC02603713	9.89	Tahmini: 14.7 kDa ribonuclease H-like protein	9.73
Hypothetical protein CQW23-04318	9.89	Tahmini: uncharacterized protein LOC109242912	9.73
Tahmini: uncharacterized protein LOC107057783	9.88	Tahmini: uncharacterized protein LOC104241801, partial	9.71
Tahmini: uncharacterized protein LOC107060529	9.87	Amino-acid permease BAT1 homolog isoform X2	9.66
DNA-directed DNA polymerase	9.87	Enzymatic polyprotein	9.66
Tahmini: cell number regülâtör 1-like	9.86	Low quality protein: uncharacterized protein LOC107023836	9.66
Probable histone-lysineN-methyltransferase ATXR5 isoform X1	9.86	Tahmini: pleiotropic drug resistance protein 1-like	9.65
Uncharacterized protein LOC107026828	9.85	Hypothetical protein CQW23-22949	9.65
Tahmini: putative pentatricopeptide repeat-containing protein At1g12700, mitochondrial	9.85	Tahmini: uncharacterized protein LOC107061285	9.65
Phospholipase A1-IIdelta	9.85	Tahmini: majör facilitator superfamily domain-containing protein 12-like	9.64
Tahmini: low quality protein: putative pentatricopeptide repeat-containing protein At1g10330	9.84	Tahmini: uncharacterized protein LOC107057783	9.64
Putative glycosyltransferase	9.84	Tahmini: TMV resistance protein N-like	9.63
Tahmini: uncharacterized protein LOC107058099	9.83	Uncharacterized protein LOC107024170	9.63
Tahmini: uncharacterized protein LOC107830625	9.81	Transcription factor Bhlh120-LIKE	9.63
Tahmini: BURP domain-containing protein 17-like	9.80	Protein root hair defective 3-like 1, partial	9.62

5.8.2. Ana – Hassas F2 arasındaki artan azalan genler

Hassas olduğu bilinen, ana olarak kullanılan *Solanum melongena* türüne ait Anamur çeşidi ve F2 generasyonundan hassas olduğu bilinen Anamur X *Solanum macrocarpon* F2 generasyonuna ait örneğin RNA dizilemeleri sonucunda ifadesi artan gen sayısı 4880 iken ifadesi azalan gen sayısı 6455'dur. Bu genlerden en fazla ifadesi artan ve azalan 40 adet genin protein dizileri ve ifade dereceleri Çizelge 5.12. ve Çizelge 5.13.'de verilmiştir.

Çizelge 5.12. Ana – Hassas F2 örnekleri arasında ifadesi en çok artan 40 gene ait bilgiler.

Genin tanımı	(İfade artışı)	Genin tanımı	(İfade artışı)
Hypothetical protein A4A49-35564	9.99	Transcription repressor MYB6-like	9.12
Tahmini: zinc finger BED domain-containing protein	9.92	17.6 kDa class I heat shock protein-like	9.12
11S globulin like	9.98	Uncharacterized protein LOC101265973	9.10
Monothiol glutaredoxin-S1-like	9.82	MADS box transcription factor, partial	9.07
Tahmini: uncharacterized protein LOC102596945	9.76	Tahmini: tyrosine decarboxylase 1-like	9.07
Hypothetical protein A4A49-49316	9.68	Tahmini: sm-like protein LSM1B	9.06
Tahmini: secoisolaricireisinol dehydrogenase-like	9.64	Hypothetical protein T459-20600	8.97
Laccase 14-like	9.61	Uncharacterized protein LOC 107026629	8.95
Tahmini: tropinone reductase homolog	9.53	Putative pectinesterase 11	8.94
Tahmini: beta-amyrin 28-oxidase-like	9.50	Auxin-responsive protein IAA1	8.88
Tahmini uncharacterized protein LOC109207297	9.49	Cytochrome P450 98A2-like	8.85
Hypothetical protein CQW23-14594	9.47	Hypothetical protein T459-20600	8.84
18.5 kDa class I heat shock protein	9.43	Mitochondrial small heat shock protein 26.4	8.80
Tahmini: boron transporter 4	9.41	Tahmini: myosin-11	8.80
Uncharacterized protein LOC101247483	9.38	Uncharacterized protein LOC 109121102	8.80
Non specific lipid transfer protein2	9.31	Tahmini: Uncharacterized protein LOC 104216917	8.78
Tahmini: small heat shock protein, chloroplastic	9.29	22.0 kDa class IV heat shock protein-like	8.78
Tahmini: putative F-box protein PP2-B12	9.26	WAT1 related protein	8.75
Hypothetical protein CQW23-00798	9.21	Tahmini: expansin-like B1	8.73
Tahmini: uncharacterized protein LOC107062266	9.14	Tahmini: 17.3 kDa class II heat shock protein-like	8.68

Çizelge 5.13. Ana – Hassas F2 örnekleri arasında ifadesi en çok azalan 40 gene ait bilgiler.

Genin tanımı	(İfade azalışı)	Genin tanımı	(İfade azalışı)
Malatedehydrogenase, glyoxysomal	9.99	Tahmini: omega-hydroxypolmitate 0-feruoytransferase	9.87
Hypothetical protein CQW23-01160	9.99	Tahmini: DNA topoisomerase 3-alpha-like	9.87
Tahmini: uncharacterized protein LOC107058077	9.99	Tahmini: uncharacterized protein LOC107058468	9.84
Protein SRG1-like	9.99	uncharacterized protein LOC14074871	9.83
Tahmini: CLIP-associated protein-like	9.97	Hypothetical protein BC332-11619	9.83
Tahmini: uncharacterized protein LOC104092110	9.97	Hypothetical protein Tanjil G-07039	9.81
İntegraase core domain containing protein	9.95	Tahmini: uncharacterized protein LOC107063478	9.81
Tahmini: uncharacterized protein LOC102580117	9.95	Uncharacterized protein LOC101249582 isoform X1	9.79
Copia protein gag-int pol protein	9.95	Tahmini: annexin D3-like	9.78
Tahmini: uncharacterized protein LOC107057783	9.94	Tahmini: uncharacterized protein LOC107858289	9.78
Tahmini: uncharacterized protein LOC102591968 İSOFORM X1	9.93	Probable serine/threonine-protein kinase WML3 isoform X1	9.77
Uncharacterized protein At1g66480-like	9.93	Tahmini: AT-hook motif nuclear-localized protein 5 isoform X1	9.77
Tahmini: thioredoxin-related transmembrane protein 2-like	9.93	Tahmini: uncharacterized protein LOC109232588	9.77
Tahmini: RNA polymerase I termination factor-like	9.93	Protein Yaf2	9.76
Hypothetical protein T459-17285	9.92	Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase alkB-like protein2	9.73
Hypothetical protein T459-02578	9.89	Tahmini: uncharacterized protein LOC107865472	9.72
Tahmini: DNA mismatch repair protein MLH isoform X9	9.89	Tahmini: putative E3 ubiquitin-protein ligase LIN-1	9.72
Polyprotein, putative	9.88	Tahmini: GPI ethanolamine phosphate transferase 1	9.71
Hypothetical protein CQW23-21109	9.88	Tahmini: squalene synthase-like isoform X2	9.71
Tahmini: uncharacterized protein LOC107829616	9.88S	Hypothetical protein SRB1-14t00021	9.71

5.8.3. Baba – Dayanıklı F1 arasındaki artan azalan genler

Dayanıklı olduğu bilinen, baba olarak kullanılan *Solanum macrocarpon* türü ve ana olarak kullanılan Anamur ve baba olarak kullanılan *Solanum macrocarpon* melezlemesi sonucunda elde edilen dayanıklı F1 bitkisine ait örneğin RNA dizilemeleri sonucunda ifadesi artan gen sayısı 1170 iken ifadesi azalan gen sayısı 4526'dır. Bu genlerden en fazla ifadesi artan ve azalan 40 adet genin tanımı ve ifade dereceleri Çizelge 5.14. ve Çizelge 5.15.'de verilmiştir.

Çizelge 5.14. Baba – Dayanıklı F1 örnekleri arasında ifadesi en çok artan 40 gene ait bilgiler.

Genin tanımı	(İfade artışı)	Genin tanımı	(İfade artışı)
Putative membrane-associated kinase regulator 3	9.70	B3 domain-containing protein Os01g0234100	7.59
Tahmini: CTD small phosphatase-like protein	9.23	Tahmini: uncharacterized protein LOC102605400	7.58
Tahmini: putative F-box protein PP2-B12	8.76	Uncharacterized protein LOC101243721	7.56
Tahmini: ethylene-responsive transcription factor WIN1-like	8.50	Hypothetical protein A4A49-34624	7.52
Tahmini:auxin-responsive protein SAUR71	8.40	Tahmini: uncharacterized protein LOC107061285	7.52
Uncharacterized protein LOC109228056	8.40	Omega-3 fatty acid desaturase, chloroplastic	7.47
UDP-glycosyltransferase 76E1	8.39	Tahmini: basic form of pathogenesis-related protein 1-like	7.44
MYB-like transcription factor ETC3	8.38	Tahmini: Glutaredoxin C1-like	7.43
Tahmini: ferric reduction oxidase 4-like	8.32	Tahmini: uncharacterized protein LOC102583514	7.28
Cytochrome P450 704C1-like	8.25	UDP-sulfoquinovose synthase, chloroplastic	7.28
Nucleosome assembly protein 1;4 isoform X3	8.17	Hypothetical protein A4A49-28617	7.23
BEL1-like homeodomain protein 10	8.16	Hypothetical protein A4A49-28617	7.20
Tahmini: uncharacterized protein LOC104098435, partial	8.01	UDP-glycosyltransferase 73C6-like	7.16
Tahmini: aspartic proteinase nepenthesin 2-like	7.98	B3 domain-containing protein At5g18000-like	7.14
Flavin monooxygenase-like protein	7.97	Uncharacterized protein LOC114075966	7.10
Uncharacterized protein LOC104645146	7.82	Probable membrane-associated kinase regülatör 4	6.95
GDSL esterase/lipase At4g10955-like	7.80	Tahmini: probable pectinesterase 53 isoform X1	6.58
DNA mismatch repair protein MSH7	7.75	Uncharacterized protein LOC107016262	6.25
Uncharacterized protein LOC102579622 isoform X2	7.67	Tahmini: protein YLS9-like	6.19
Tahmini: E3 ubiquitin-protein ligase ATL4	7.64	Putative lipid-transfer protein DIR1	6.12

Çizelge 5.15. Baba – Dayanıklı F1 örnekleri arasında ifadesi en çok azalan 40 gene ait bilgiler.

Genin tanımı	(İfade azalışı)	Genin tanımı	(İfade azalışı)
Tahmini: uncharacterized protein LOC107059112	9.98	Tahmini: uncharacterized protein LOC07840249	9.75
Tahmini: F-box/FBD/LRR repeat protein At1g3570- like isoform X1	9.96	B3 domain-containing protein At2g33720-like	9.68
Hypothetical protein T459-33810	9.96	Tahmini: uncharacterized protein LOC101265957	9.68
Tahmini: uncharacterized protein LOC107868232 isoform X1	9.95	TPA: orf y	9.65
Phosphoglucan, water dikinase, chloroplastic isoform X1	9.95	Hypothetical protein T459-20356	9.63
Tahmini: multicystatin-like	9.95	Low quality protein: uncharacterized protein LOC107023836	9.57
Hypothetical protein A4A49-54874	9.95	Tahmini: probable galactinol-sucrose galaktotransferase 2 isoform X1	9.55
Tahmini: uncharacterized protein LOC107060461	9.95	Putative F-box protein PP2-B12	9.55
Tahmini: uncharacterized protein LOC107063429	9.95	Tahmini: uncharacterized protein LOC107063429	9.52
Tahmini: uncharacterized protein LOC102599371	9.91	Tahmini: ubiquitin conjugating enzyme E2-17 kDa-like	9.51
Tahmini: putative late blight resistance protein homolog R1B-23	9.91	Tahmini: uncharacterized protein LOC102600866	9.51
Hypothetical protein T459-02578	9.89	Tahmini: GATA transcription factor 28-like	9.46
Tahmini: LRR receptor-like serine/threonine protein kinase	9.83	Hypothetical protein BC332-22960	9.44
Tahmini: uncharacterized protein LOC107062863	9.86	Tahmini: calmodulin-binding transcription activator 1-like isoform X3	9.44
Hypothetical protein B332-03618	9.86	Tahmini: uncharacterized protein LOC107059378	9.44
Tahmini: uncharacterized protein LOC109224466	9.86	Tahmini: uncharacterized protein LOC107058694	9.41
Hypothetical protein T459-24004	9.84	Tahmini: uncharacterized protein LOC109221250	9.39
Tahmini: uncharacterized protein LOC107057783	9.80	Tahmini: uncharacterized protein LOC109231716	9.37
Tahmini: uncharacterized protein LOC107059660	9.79	Tahmini: uncharacterized protein LOC107061178	9.37
Tahmini: replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit B-like	9.76	Tahmini: F-box protein PP2-B10 like	9.36

5.8.4. Baba – Dayanıklı F2 arasındaki artan azalan genler

Dayanıklı olduğu bilinen, baba olarak kullanılan *Solanum macrocarpon* türü ve ana olarak kullanılan Anamur ve baba olarak kullanılan *Solanum macrocarpon* melezlemesi sonucunda elde edilen dayanıklı F1 bitkilerinin kendilenmesi sonucunda elde edilen F2 generasyonundan Dayanıklı F2 bitkilerinin RNA dizilemeleri sonucunda ifadesi artan gen sayısı 182 iken ifadesi azalan gen sayısı 4627'dir. Bu genlerden en fazla ifadesi artan ve azalan 40 adet genin protein dizileri ve ifade dereceleri Çizelge 5.16. ve Çizelge 5.17.'de verilmiştir.

Çizelge 5.16. Baba – Dayanıklı F2 örnekleri arasında ifadesi en çok artan 40 gene ait bilgiler.

Genin tanımı	(İfade artışı)	Genin tanımı	(İfade artışı)
Tahmini: ABC transporter family member 7-like	9.93	Hypothetical protein BC332-15916	5.42
Tahmini: probable nudeoredoxin 1	9.64	Auxin-induced protein X15-like	5.16
Tahmini: uncharacterized protein LOC104093903	8.87	Beta-glucosidase 13-like isoform X1	4.91
EG-45-like domain containing protein isoform X1	8.82	Cytochrome P450 704C1-like	4.91
Tahmini: pentatricopeptide repeat containing protein At3g29230	8.68	Cation/ H (+) antiporter 11-like	4.85
F-box protein At5g49610-like	8.60	Hypothetical protein BC332-04237	4.78
Tahmini: serine carboxypeptidase-like 31	8.55	Tahmini: uncharacterized protein LOC107058029	4.77
Tahmini: uncharacterized protein LOC109228056	8.35	BEL1-like homedomain protein 10	4.74
Nucleosome assembly protein 1;4 isoform X3	8.12	Tahmini: putative late blight resistance protein homolog R1A-10	4.44
Organ-specific protein S2	8.01	Tahmini: uncharacterized protein LOC109207914	4.22
Tahmini: uncharacterized protein LOC104098435, partial	7.96	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 2	4.15
Polyprotein, 3'- partial, putative	7.91	Tahmini: auxin responsive protein SAUR71	4.13
Tahmini: uncharacterized protein LOC107061285	7.47	Elongation factor 11-gamma 2	4.12
Uncharacterized protein LOC101256997	7.44	Tahmini: uncharacterized protein LOC102598893	4.04
Low quality protein: uncharacterized protein LOC107017990	7.29	Gibberellin 2-oxidase 1	3.98
Protein strictosidine synthase-like 13	7.25	Tahmini: uncharacterized protein LOC107060037	3.69
Tahmini: uncharacterized protein LOC102581414 isoform X1	6.55	3-ketoacyl-CoA synthase 5-like	3.65
Tahmini: WAT1-related protein At1g70260-like	5.80	Tahmini: protein NRT1/PTR family 7.3 like	3.60
Tahmini: nicotianamine synthase	5.73	Ty3/gypsy retrotransposon protein	3.58
Tahmini: uncharacterized mitochondrial protein AtMg00300-like	5.45	Inorganic pyrophosphatase 1-like	3.53

Çizelge 5.17. Baba – Dayanıklı F2 örnekleri arasında ifadesi en çok azalan 40 gene ait bilgiler.

Genin tanımı	(İfade azalışı)	Genin tanımı	(İfade azalışı)
Tahmini: uncharacterized protein LOC109214084	9.98	DNAj protein-like protein	9.80
Tahmini: temperature-induced lipocalin-1-like	9.98	Tahmini: 14.7 kDa ribonuclease H-like protein	9.80
60S ribosomal protein L6 (YL 16 like)	9.98	TTS protein	9.78
Malate dehydrogenase	9.96	Autophagy-related protein 8d	9.78
Vacuolar-processing enzyme-like isoform X1	9.96	Dehydration responsive element binding protein 1E-like	9.78
Predicted protein	9.94	Tahmini: uncharacterized protein LOC107764446	9.77
Vacuolar protein 8	9.94	5-aminolevulinate synthase, mitochondrial like	9.77
Unnamed protein product	9.94	UDP-glycosyltransferase/glycogen phosphorylase	9.75
4-coumarate-CoA ligase 1	9.93	Profilin-1-like	9.75
Predicted protein	9.93	Hypothetical chloroplast RF21	9.72
ATP synthase subunit gamma, mitochondrial-like	9.89	Hypothetical protein CQW23-32030	9.72
Tahmini: TMV resistance protein N-like	9.88	Tahmini: uncharacterized protein LOC107061285	9.72
Hypothetical protein VITISV-006810	9.87	Phosphoglucan, water dikinase, chloroplastic isoform X1	9.71
Tahmini: ribonuclease H-like	9.87	Tahmini: uncharacteristic protein LOC107061026	9.71
Inorganic pyrophosphatase-like	9.87	Heat shock protein 83	9.69
ATP synthase F1, delta subunit	9.82	Tahmini: ribonuclease H-like	9.69
Hypothetical protein PINS-013010	9.82	Hypothetical protein MARPO-0007s0188	9.68
Predicted protein	9.82	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	9.68
2-keto-3-deoxy-L-rhammonate aldolase	9.81	Tahmini: uncharacterized protein LOC107599371	9.66
Hypothetical protein CQW23-29043	9.81	Tahmini: high mobility group B protein 7	9.66

5.8.5. Dayanıklı F1 – Dayanıklı F2 arasındaki artan azalan genler

Hassas ana (*Solanum melongena* / Anamur) ile dayanıklı baba (*Solanum macrocarpon*) bitkilerinin melezlenmesi sonucu elde edilen Dayanıklı F1 bitkisi ve bu F1 bitkilerinin kendilenmesi sonucu elde edilen Dayanıklı F2 bitkisine ait örneğin RNA dizilemeleri sonucunda ifadesi artan gen sayısı 398 iken ifadesi azalan gen sayısı 1923'tür. Bu genlerden en fazla ifadesi artan ve azalan 40 adet genin tanımı ve ifade dereceleri Çizelge 5.18. ve Çizelge 5.19.'da verilmiştir.

Çizelge 5.18. Dayanıklı F1 – Dayanıklı F2 örnekleri arasında ifadesi en çok artan 40 gene ait bilgiler.

Genin tanımı	(İfade artışı)	Genin tanımı	(İfade artışı)
Tahmini: F-box/FBD/LRR-repeat protein At1g13570-like isoform X1	9.86	Tahmini: putative F-box protein At1g47790	7.35
Tahmini: putative F-box protein PP2-B12	9.45	Hypothetical protein CQW23-19552, partial	7.35
Tahmini: uncharacterized protein LOC104233435	9.24	Retrovirus-related Pol polyprotein from transposon TBT 1-94	7.35
Tahmini: low quality protein: putative late blight resistance protein homolog R1A-3	9.13	Tahmini: Uncharacterized protein LOC107841222	7.32
Tahmini: serine carboxypeptidase-like 31	9.05	Uncharacterized protein LOC107013353	7.28
Tahmini: carotenoid 9,10-cleavage dioxygenase 1-like	8.98	Tahmini: apoptosis-enhancing nuclease	7.21
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 13	8.61	Senescence-specific cysteine protease SAG39	7.21
Tahmini: uncharacterized p0protein LOC104246227	8.58	Hypothetical protein BC332-26629	7.14
Tahmini: Uncharacterized protein LOC107843201 isoform X1	8.53	Uncharacterized protein LOC114074719	7.14
Tahmini: Uncharacterized protein LOC107058468	8.34	Tahmini: nuclear transcription factor Y subunit C-1-like isoform X1	7.14
Putative retrotransposon protein, identical	8.13	Uncharacterized protein LOC107013353	7.06
Tahmini: Tahmini: Uncharacterized protein LOC107057873	8.00	Hypothetical protein BC332-15916	7.06
Pathogenesis-related protein 1A-like	7.97	Uncharacterized protein LOC107016780	7.06
Tahmini: Uncharacterized protein LOC104093903	7.69	putative polyprotein(aspartic proteinase, reverse transcriptase, ribonuclease)	7.06
Uncharacterized protein LOC101247483, isoform X2	7.59	Tahmini: probable pre- mRNA-splicing factor ATP dependent RNA helicase DEAH9	7.06
Putative gag-pol polyprotein, identical	7.53	Protein detoxification 44 chloroplastic	7.06
Tahmini: probable carboxylesterase 15	7.53	polyprotein	7.06
Tahmini: beta-glucosidase 1-like isoform X1	7.43	Hypothetical retrotransposon	7.06
Tahmini: LRR receptor-like serine/threonine protein kinase FLS2	7.41	Putative gag-pol polyprotein, identical	5.58
Tahmini: Uncharacterized protein LOC107061178	7.35	Tahmini: F-box/kelch-repeat protein At3g06240-like	5.39

Çizelge 5.19. Dayanıklı F1 – Dayanıklı F2 örnekleri arasında ifadesi en çok azalan 40 gene ait bilgiler.

Genin tanımı	(İfade azalışı)	Genin tanımı	(İfade azalışı)
Cytochrome c oxidase subunit 6, mitochondrial-like	9.99	Hypothetical protein MARPO-0007s0188	9.66
Tahmini: temperature-induced lipocalin-1-like	9.97	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	9.66
Malate dehydrogenase	9.94	Annexin D5	9.61
Predicted protein	9.93	Tahmini: probable 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase AOP1	9.60
Unnamed protein product	9.93	Polyprotein, 3'-partial, putative	9.60
Predicted protein	9.92	F-ATPase family transporter: protons (mitochondrial)	9.58
4-coumarate-CoA ligase 1	9.92	Transcription factor MYB106-like	9.58
Protein yippee-like At3g08990	9.89	Hypothetical protein BWQ96-04944	9.55
Inorganic pyrophosphatase-like, partial	9.85	GD5L esterase/lipase At5g33370	9.55
Predicted protein, partial	9.82	Elongation factor 1-beta-like	9.53
Hypothetical protein GUTHDRAFT-97260	9.82	Hypothetical protein EMIHU DRAFT-238496	9.53
Xanthine dehydrogenase	9.82	Tahmini: GTP binding nuclear protein Ran	9.50
Predicted protein	9.81	Hypothetical protein PHAVU-006G072600g	9.50
Hypothetical protein PINS-013010	9.81	Amidophosphoribosyltransferase, chloroplastic-like	9.50
ATP synthase F1, delta subunit	9.8	Tahmini: cytochrome c	9.48
DNAj protein-like protein	9.78	Acyl-binding	9.46
Autophagy-related protein 8d	9.77	Hypothetical protein GUTHDRAFT-85427	9.43
5-aminolevulinic synthase, mitochondrial like	9.75	Hypothetical protein PHYPA-018935	9.41
UDP-glycosyltransferase/glycogen phosphorylase	9.74	Hypothetical protein APUTEX2004767, partial	9.41
Profilin 1 like	9.74	Predicted protein	9.41

5.8.6. Dayanıklı F2 – Hassas F2 arasındaki artan azalan genler

Hassas ana (*Solanum melongena* / Anamur) ile dayanıklı baba (*Solanum macrocarpon*) bitkilerinin melezlenmesi sonucu elde edilen Dayanıklı F1 bitkisinin kendilenmesi sonucu elde edilen Dayanıklı F2 ve Hassas F2 bitkisine ait örneğin RNA dizilemeleri sonucunda ifadesi artan gen sayısı 1018 iken ifadesi azalan gen sayısı 2639'dur. Bu genlerden en fazla ifadesi artan ve azalan 40 adet genin tanımı ve ifade dereceleri Çizelge 5.20. ve Çizelge 5.21.'de verilmiştir

Çizelge 5.20. Hassas F2 - Dayanıklı F2 örnekleri arasında ifadesi en çok artan 40 gene ait bilgiler.

Genin tanımı	(İfade artışı)	Genin tanımı	(İfade artışı)
Tahmini: Fnucleoredoxin 1	9.44	Tahmini: beta-D-glucosyl crocetin beta-1,6-glucosyltransferase-like	7.90
Tahmini: Cationic peroxidase 1-like	9.35	Tahmini: nuclear transcription factor Y subunit C-1 like isoform X1	7.81
Tahmini: G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g03230	9.30	NADH dehydrogenase subunit 5 (mitochondrion)	7.72
Tahmini: uncharacterized p0rotein LOC104238734, partial	9.30	Tahmini: Uncraniofacial development protein 2-like, partial	7.67
Low quality protein: putative late blight resistance protein homolog R1A-3	9.18	Tahmini: LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FLS2	7.61
Polyprotein 3'-partial, putativeipartial	9.08	Tahmini: beta-fructofuranosidase, insoluble isoenzyme CWINV3-like	7.61
F-box protein At5g49610-like	8.96	Tahmini: beta amylin 28-oxidase-like	7.44
Tahmini: loricrin-like	8.81	Maturase, partial	7.44
Aldo-keto reductase 4B	8.81	Retrovirus-related Pol polyprotein from transposon TNT 1-94	7.44
Tahmini: probable calcium-binding protein CML30	8.69	Hypothetical protein A4A49-40526	7.44
Cytochrome	8.56	Tahmini: endoglucanase 12	7.38
Receptor kinase-like protein Xa21	8.47	Tahmini: RING-H2 finger protein ATL40-like	7.38
Homeobox-leucine zipper protein ATHB-40-like	8.38	Hypothetical protein BC332-01899	7.38
Hypothetical protein T459-20511	8.18	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinaseAt1g11330 isoform X2	7.38
Tahmini: uncharacterized p0rotein LOC102591434	8.14	Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At3g47570	7.36
Hypothetical protein CQW23-05344	8.4	Uncharacterized protein LOC114078010	7.32
Tahmini: receptor-like protein 12	8.07	Tahmini: Uncharacterized protein LOC107784254	7.32
Serine carboxypeptidase-like 18	8.07	Tahmini: Uncharacterized protein LOC108946989	7.32
Hypothetical protein BC332-27078	7.99	Hcr2-p3	7.29
Tahmini: Uncharacterized protein LOC107060002	7.99	Hypothetical protein CQW23-19552, partial	7.25

Çizelge 5.21. Hassas F2 - Dayanıklı F2 örnekleri arasında ifadesi en çok azalan 40 gene ait bilgiler.

Genin tanımı	(İfade azalışı)	Genin tanımı	(İfade azalışı)
Malate dehydrogenase	9.98	UDP-glycosyltransferase/glycogen phosphorylase	9.77
Predicted protein	9.96	Profilin 1 like	9.77
Unnamed protein product	9.96	Heat shock protein 83	9.71
Predicted protein	9.95	Hypothetical protein MARPO-0007s0188	9.70
4-coumarate-CoA ligase 1	9.95	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	9.70
Chitin binding	9.94	Hypothetical protein FCC311-102042	9.68
Chloroplast polyphenol oxidase precursor	9.92	Tahmini: high mobility group B protein 7	9.68
ATP synthase subunit gamma, mitochondrial-like	9.91	İsositrate NADP-dependent isoform B	9.68
İnorganic pyrophosphatase-like	9.88	Annexin D5	9.65
Predicted protein, partial	9.86	Tahmini: F-box protein At3g07870-like	9.65
Hypothetical protein GUTHDRAFT-97260	9.86	F-ATPase family transporter: protons (mitochondrial)	9.62
Xanthine dehydrogenase	9.86	Transcription factor MYB106-like	9.62
Predicted protein	9.84	Hypothetical protein BWQ96-04944	9.58
Hypothetical protein PINS-013010	9.84	GDSL esterase/lipase At5g33370	9.58
ATP synthase F1, delta subunit	9.84	Elongation factor 1-beta-like	9.57
2-keto-3-deoxy-L-rhamnose aldolase	9.83	Hypothetical protein EMIHUDRAFT-238496	9.57
DNAj protein-like protein	9.80	Tahmini: GTP-binding nuclear protein Ran	9.53
TTS protein	9.80	Hypothetical protein PHAVY-006G072600g	9.53
Autophagy-related protein 8d	9.80	Amidophosphoribosyltransferase, chloroplastic-like	9.53
5-aminolevulinate synthase, mitochondrial-like	9.79	Tahmini: cytochrome c	9.51

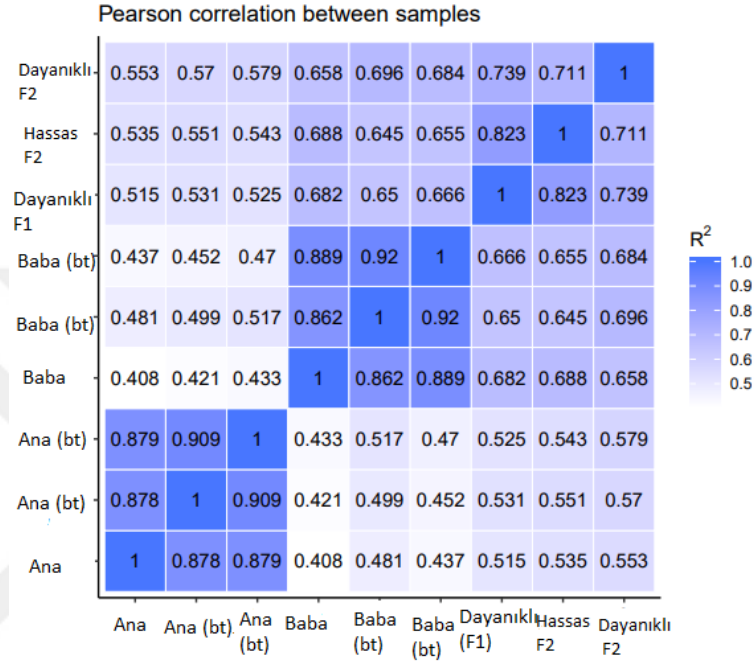
Çizelge 5.10. - Çizelge 5.21.'de melezleme kombinasyonlarına göre sunulan genler en çok artış ve azalış gösteren genlerdir. Kayda değer bir artış gösteren bu genler mevcut literatür ışığında doğrudan fusarium dayanıklılığı / hassaslığı ile ilişkilendirilememiştir. Tespit edilen genlerden fusarium dayanıklılığı / hassaslığı ile literatürde ilişkilendirilmiş olanlar tartışma kısmında sunulmuştur.

5.9. Örneklerle ait Korelasyonlar

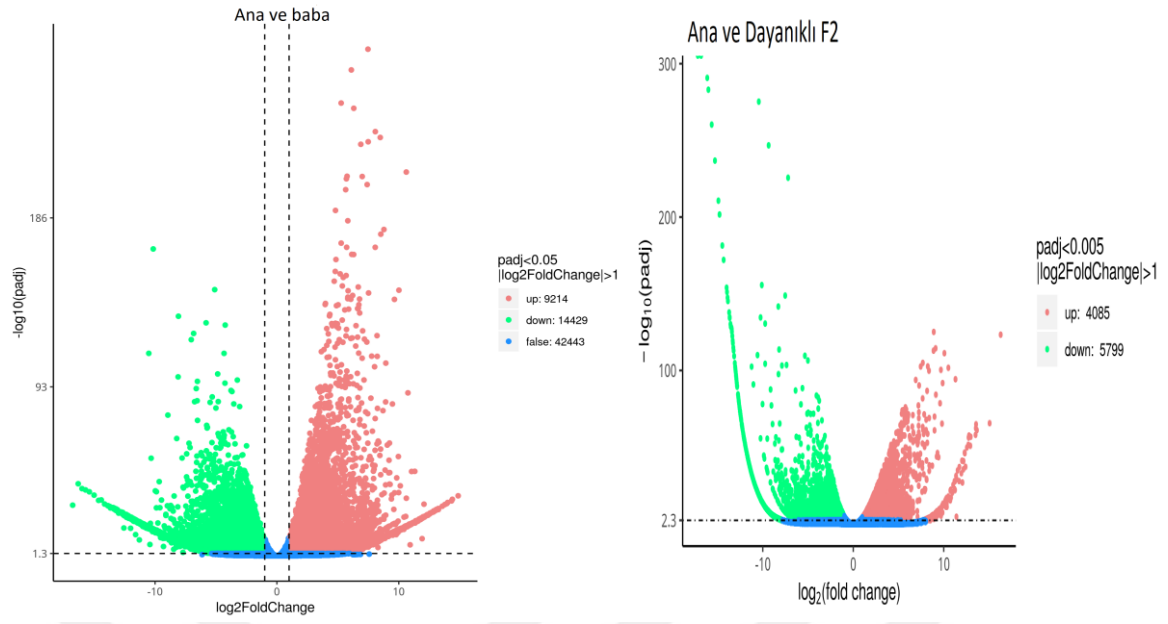
Örneklerle ait farklı ifade olan genler (Differentially Expressed Genes) arasındaki korelasyonlar pearson korelasyon katsayıları ile belirlenmiştir (Şekil 5.17.).

Örneklerin karşılaştırmaları dikkate alındığında Ana - Baba ikilisi arasındaki korelasyon 0.408, Ana – Hassas F2 arasında 0.535, Ana – Dayanıklı F1 arasında 0.515, Baba - Dayanıklı F2 arasında 0.658, Baba – Dayanıklı F1 arasında 0.682, Dayanıklı F1 – Hassas F2 arasında 0.823, Dayanıklı F1 – Dayanıklı F2 arasında 0.739, Dayanıklı F2 – Hassas F2 arasında 0.711 olarak tespit edilmiştir. Biyolojik kontroller karşılaştırıldığında Ana örneğinin biyolojik kontrolleri arasındaki korelasyon 0.909 iken Baba örneğinin biyolojik kontrolleri arasındaki korelasyon 0.92 olarak tespit edilmiştir (Şekil 5.17.).

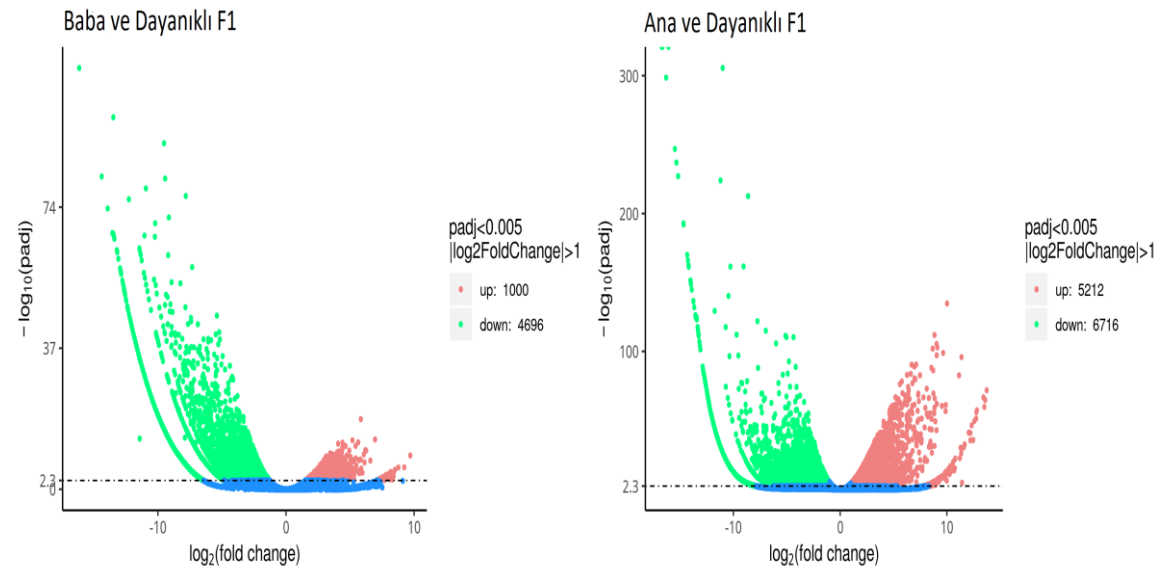
Örnekler arasındaki korelasyon ilişkisine ayrıntılı olarak bakılırsa bütün örneklerin en düşük korelasyonu ana örnekleri ile gösterdiği, ana örneklerinin en yüksek korelasyonu Dayanıklı F2 - Hassas F2 ile gösterirken; baba örneklerinin Dayanıklı F1 ile, Dayanıklı F1'in ise Hassas F2 ve Dayanıklı F2 ile en yüksek korelasyonu gösterdiği görülmektedir (Şekil 5.17.).



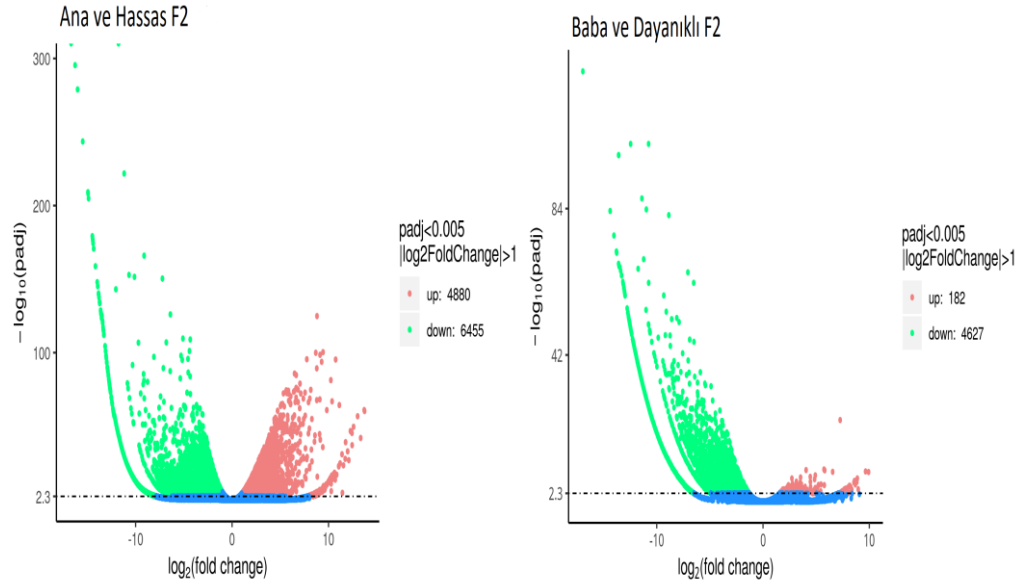
Şekil 5.17. 9 adet örneğe ait korelasyonlar.



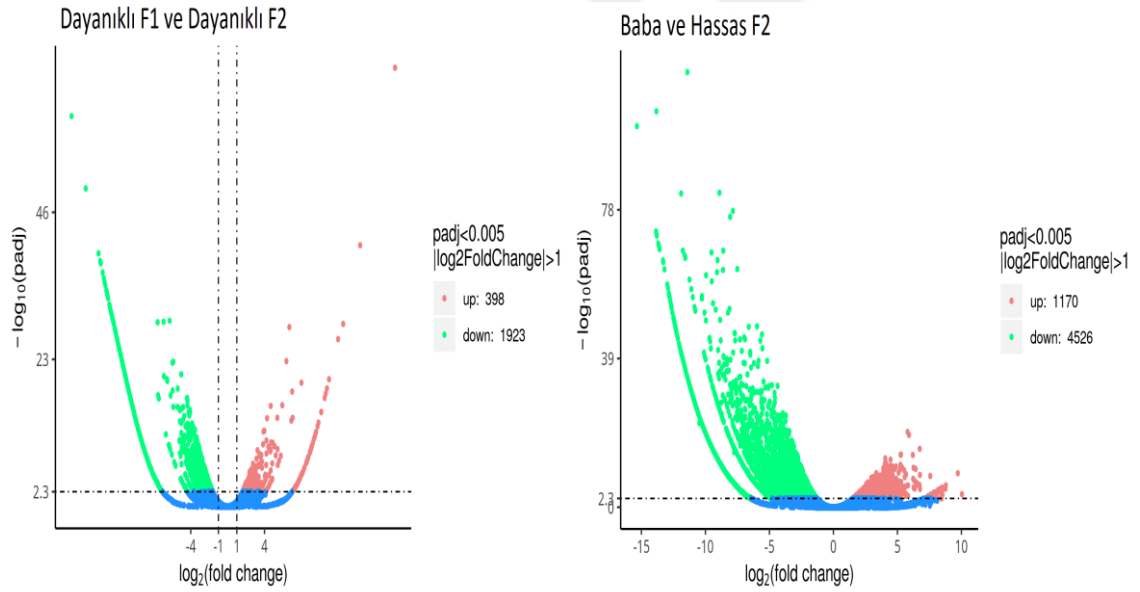
Şekil 5.18. Ana ve Baba & Ana ve Dayanıklı F2 örneklerinin Volcano plot analizleri.



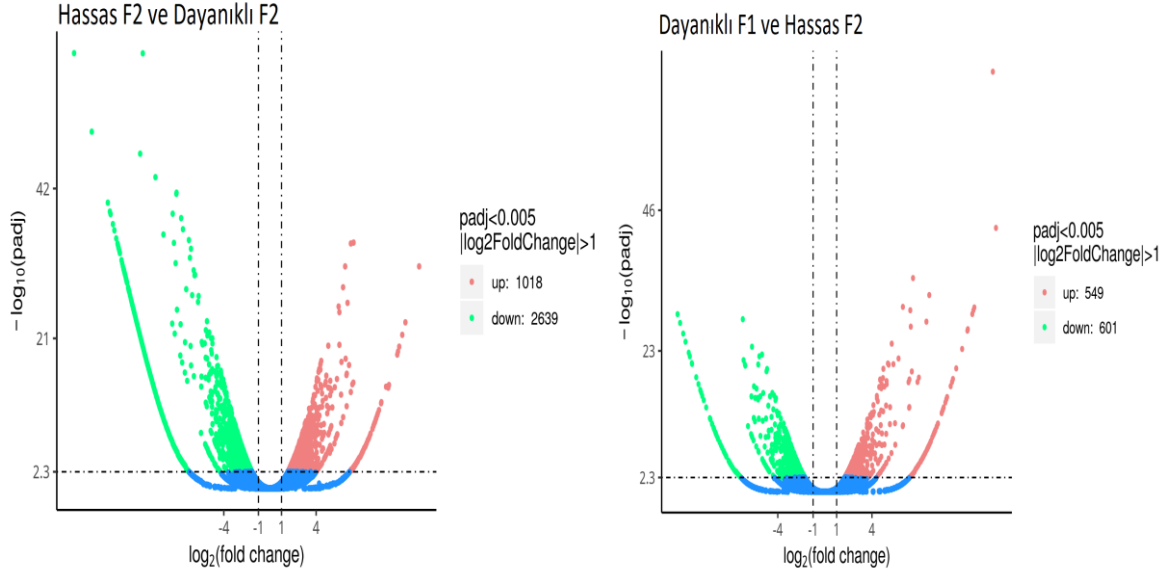
Şekil 5.19. Baba ve Dayanıklı F1 & Ana ve Dayanıklı F1 örneklerinin Volcano plot analizleri.



Şekil 5.20. Ana ve Hassas F2 & Baba ve Dayanıklı F2'nin Volcano plot analizleri.



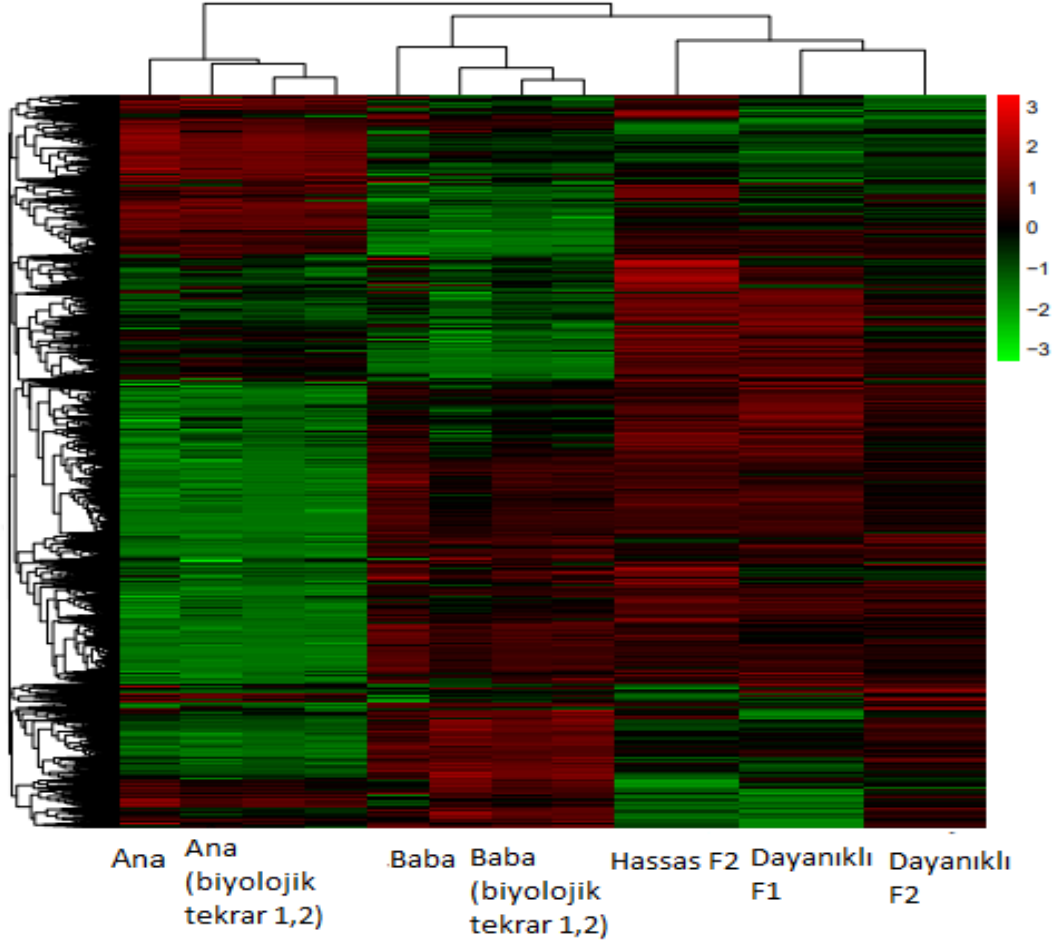
Şekil 5.21. Dayanıklı F1 ve Dayanıklı F2 & Baba ve Hassas F2'nin Volcano plot analizleri.



Şekil 5.22. Hassas F2 ve Dayanıklı F2 & Dayanıklı F1 ve Hassas F2'nin Volcano plot analizleri.

Fold change (Kat Değişikliği), ekspresyon seviyelerindeki değişimleri kat cinsinden göstermekte; logaritma cinsinden ifade edilmektedir (152). Ekspresyon seviyeleri Volcano plot olarak karşılaştırılmıştır. Kat artışına göre yapılan Volcano plot analizlerinde; Ana - Baba örneklerinin artan azalan sayısı 9214 - 14.429 (Şekil 5.18.), Dayanıklı F2 – Hassas F2 örneklerinin artan azalan sayısı 1018 - 2639 (Şekil 5.22.), Dayanıklı F1 – Dayanıklı F2 örneklerinin artan azalan sayısı 398 - 1923 (Şekil 5.21.), Dayanıklı F1 – Hassas F2 örneklerinin artan azalan sayısı 549 - 60 (Şekil 5.22.), Ana – Hassas F2 örneklerinin artan azalan sayısı 4880 - 6455 (Şekil 5.20.), Baba – Dayanıklı F2 örneklerinin artan azalan sayısı 182 - 4627 (Şekil 5.20.), Ana – Dayanıklı F2 örneklerinin artan azalan sayısı 4085 - 5799 (Şekil 5.18.), Baba - Dayanıklı F1 örneklerinin artan azalan sayısı 1000 - 4996 (Şekil 5.19.), Ana – Dayanıklı F1 örneklerinin artan azalan sayısı 5212 - 6716 (Şekil 5.19.), Baba - Hassas F2 örneklerinin artan azalan sayısı 1170 - 4526 (Şekil 5.21.) olarak tespit edilmiştir.

5.10. Örneklere ait Heatmap Analizleri



Şekil 5.23. 9 adet örnekte genlerin ekspresyon seviyelerine göre ısı haritası.

Heatmap (ısı haritası) analizi 9 örneğe ait (Ana - Ana biyolojik tekrar 1, 2 – Baba – Baba biyolojik tekrar 1, 2 – Hassas F2, Dayanıklı F1 – Dayanıklı F2) ait ifade edilen genlerin ekspresyon seviyelerine; FPKM düzeyindeki renk tonlarına göre oluşturulmuştur. Bu verilere göre 9 adet örneğin gen ifade seviyelerinde farklılık olduğu görülmektedir. Heatmap analizine göre genler ana olarak 2 gruba ayrılmıştır. Birinci grupta Ana örneğine ait genler yer alırken, ikinci grup kendi arasında gruplara ayrılmış; dayanıklı F1 – dayanıklı F2 örneğine ait genler aynı grupta yer almıştır (Şekil 5.21.).

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Stres, bitkilerde büyümeyi - gelişmeyi - verimi etkileyebilen; dışarıdan kaynaklanan koşullardan meydana gelmektedir. Stres bitkideki değişen gen ifadesi, hücresel metabolizma, büyüme oranlarındaki değişiklikler, ürün verimi gibi birçok tepkiyi tetiklemektedir. Bitki stresi genellikle meydana gelen ani değişimleri ifade etmektedir. Bununla birlikte, strese toleranslı bitki türlerinde belirli bir strese maruz kalmak zamanla söz konusu strese alışmaya yol açabilmektedir. Bitki stresi biyotik ve abiyotik stres olmak üzere 2'ye ayrılır. Abiyotik stres çevre tarafından bitkilere uygulanan fiziksel ve kimyasal etmenler olabilirken; biyotik stres biyolojik bir birimdir. Bitkilerin maruz kaldığı bazı stresler bitkilerde çeşitli metabolik işlev bozukluklarına neden olur. Stres hafif veya kısa süreliyse etki geçici olduğu için bitkiler yaralanmalardan kurtulabilirken; şiddetli stresler çiçeklenmeyi, tohum oluşumunu önleyerek yaşlanmaya neden olarak bitkilerin ölümüne yol açar. Bitkilerde biyotik strese virüs, bakteri, fungus, nematod, böcek, yabancı ot gibi organizmalar neden olur. Biyotik strese neden olan etmen, konukçusunu doğrudan besin maddelerinden yoksun bırakarak bitkilerin ölümüne yol açabilir. Biyotik stres, hasat öncesi ve sonrası meydana getirdiği kayıplar nedeni ile önemlidir. Bitkiler adaptif bağışıklık sisteminden yoksun olmalarına rağmen; kendilerini belirli stratejilere evrimleştirerek biyotik streslere karşı koyabilirler. Bu streslere karşı harekete geçen savunma mekanizması bitkilerde genetik olarak kontrol edilmektedir. Biyotik streslere karşı dayanıklılığı sağlayan genler bitki genomlarında bulunmaktadır. Biyotik stres tuzluluk, güneş ışığı, sıcaklık, soğuk, kuraklık gibi bitkilerin maruz kaldığı; bitki üzerinde olumsuz etkiye sahip olan abiyotik stresten tamamen farklıdır (154).

Biyotik stres dünyada ve ülkemizde bitki yetiştiriciliğini kısıtlayan önemli etmenlerdendir. *Solanum melongena*'da birçok biyotik etmenden zarar görmekte; verim kaybı yaşamaktadır. *Solanum melongena*'da çalışmanın konusu olan fungal patojene (*Fusarium oxysporum melongenae*) dayanıklılık ülkemizde yetiştiriciliği yapılan çeşitlerde bulunmamaktadır.

Fusarium solgunluğunun patlıcanda görülmesiyle birlikte; patlıcanda dayanıklılık ile ilgili çalışmalar hızlanmıştır. *Fusarium* dayanıklılığına bakıldığında; Gana' da LS1934, LS174, LS2436 germplazmalarının *Fomg*'ye dayanıklı olduğu; *Solanum aethiopicum* gr. *Gilo* türünde dayanıklılığın kromozom 2 üzerindeki dominant gen olan '*Rfo-sa1*' ile kontrol edildiği görülmektedir (155, 156).

Patlıcanda Türler Arası Melezleme

Patlıcanda türler arası melezlemeler farklı amaçlarla yapılmaktadır. Bu melezlemelerde bazen başarı sağlanmakta bazen de farklı sorunlar ortaya çıkabilmektedir. Patlıcanda türler arası melezleme çalışmalarına bakıldığında, *S. melongena* ve *S. aethiopicum* gr. *Gilo*, *S. melongena* ve *S. integrifolium* arasında protoplast elektrofüzyonu ile somatik hibritler elde edildiği görülmektedir (60). *Solanum melongena* ile farklı türlerin melezlendiği bir başka çalışmada da *S. melongena* ve *S. insanum* türlerinin melezlenmesinde başarı sağlandığı bildirilmiştir (157). *S. melongena* X *S. aethiopicum*, *S. melongena* X *S. integrifolium* somatik melezlemelerinin yapıldığı çalışmada melezlemelerde başarı sağlanmıştır (60). *S. melongena* ve *S. linneannum*'un da başarılı bir şekilde melezlenebildiği araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (63). Bütün bu çalışmalara bakıldığında, türlerden birinin *S. melongena* olduğu türler arası melezlemelerin bazılarında klasik melezleme ile başarı sağlanırken; bazılarında özel melezleme teknikleri kullanılması gerektiği görülmektedir.

Tez çalışmasının konusu olan *Fomg* direnci açısından yapılan çalışmalara bakıldığında çoğunlukla somatik melezlemeler yapılarak başarı sağlandığı görülmektedir. Bu tez çalışmasının temelinde farklı türler kullanarak, türler arası melezlemelerden kaynaklanan ıslah engellerini en aza indirmek amaçlanmıştır.

Dizileme Sonucunda İfade Edilen Genler

Patlıcanda *Fusarium* solgunluğuna dayanıklılık genellikle yabani türlerde bulunmaktadır. Transkriptom çalışmaları dayanıklılık ile ilgili gen ve allellerin seçimine olanak sağlayabilir (151).

Bu tez çalışmasında da dayanıklı - hassas örnekler ve bu örneklerin sonraki generasyonları sekanslanarak dayanıklılıkta rol oynayan genler ve ifadelerinin değişimi belirlenmeye çalışılmıştır.

Bitkilerde strese karşı verilen yanıtlar arasında transkripsiyon faktörleri oldukça önemlidir. Transkripsiyon faktörleri arasında Apetala 2(AP2)/ERF en büyük alt gruptan birisidir ve tek bir AP2 domaini ile karakterize edilmektedir. ERF'ler stres ile ilgili genlerin aktivatörü olabildiği gibi; baskılayıcı olarak da görev alabilirler (158). Fungal patojenler ile yapılan çalışmalara bakıldığında VpERF2 ve VpERF3'ün transgenik tütünde fungal patojen *Phytophthora parasitica*' ya karşı direnci arttırırken; VpERF1'in fungal patojene

duyarlılığı arttırdığı belirtilmiştir (159). Benzer olarak OsERF922'nin aşırı ekspresyonunun *Magnaporthe oryzae*'ye karşı duyarlılığı arttırdığı belirtilmiştir (160). Başka bir çalışmada, AtERF4; jasmonik asit ile ilişkili savunma genlerini baskılayarak *Fusarium oxysporum*'a karşı duyarlı hale getirirken; AtERF2'nin jasmonik asit ile ilişkili savunma genlerinin pozitif düzenleyicisi olarak hareket ederek *F. oxysporum*'a direnç kazandırmıştır (158).

Bu tez çalışmasının sonuçlarına bakıldığında; (Protein ID: XP_006365343.1: Ethylene – responsive transcription factor ERF106-like (*Solanum tuberosum*)) tanımlı genin hassas örneklerde ifade edilirken; baba örneğinde ifade edilmediği görülmektedir. Bu sonuçlardan hareketle, bu genin *Fusarium oxysporum melongenae* dayanıklılığında ifadesinin azalırken; hastalığa duyarlılıkta ifadesinin arttığı söylenebilir. Protein ID: XP_006358864.2: ethylene responsive transcription factor ERF027-like (*Solanum tuberosum*) tanımlı genin ifadesine baktığımızda bütün örneklerde ifade edildiği fakat hassas örneklerde daha fazla ifade edildiği görülmektedir. Örneklerin tamamında ethylene responsive transkripsiyon faktörlerinden sorumlu genlere baktığımızda sadece 2 hassas örnekte ifade edilen genler vardır. Bu genlerin sadece hassas örneklerde olması hastalığa duyarlılıkla ilişkilendirilebilir. Bu genlerden bazıları ifade artışı ile bazıları ise ifade azalışı ile bu duyarlılığı sağlamaktadır; bu da literatürdeki bilgilerle uyumaktadır. Bu genlerin protein ID'leri: XP_006359239.1, XP_004237817.1, PHU17989.1, XP_015163844.1, XP_015074965.1, PHT82646.1, XP_006347004.1, XP_006340524.1, XP_006342909, XP_004243505.1, XP_006350680.1, XP_006356236.1, PHU29562.1, PHT63106.1, XP_015165485.1, XP_016439809.1, XP_019236859.1, XP_006351893.1, PHT43390.1, XP_004233631.1, NP_001275603.1, XP_006344128.1, AAD31397.1, XP_016545474.1, XP_015068523.1, XP_016500973.1, XP_00630214.1, XP_006339943.2, XP_015058030.1, XP_006359240.1, PHT57876.1, XP_027769004.1' dir. Tez çalışmamızdan elde edilen sonuçlardan hassas/dayanıklı örnekler arasındaki ERF ile ilişkili genlere baktığımızda sadece ifadesi azalan 3 tane ERF ile ilişkili gen bulunmuştur. Bu genlerden XP_006343893 protein ID'li 'Ethylene-responsive transcript factor CRF2'nin ana-baba arasında ifadesinin 1.9 kat azalırken; hassas F2-dayanıklı F2 arasında 3 kat azaldığı görülmektedir. XP_006361741.1 protein ID'li 'Ethylene responsive transcription factor ERF011-like'nın ana-baba arasında ifadesi 1.4 kat azalırken; hassas F2 - dayanıklı F2 örnekleri arasında 2 kat azalmıştır. Protein ID'si XP_006361576 olan 'AP2-like ethylene-responsive transcription factor AIL5' protein tanımlı genin ifadesi ana-baba

arasında 1.2 kat azalış gösterirken; hassas F2 - dayanıklı F2 örnekleri arasında 2.8 kat azalış göstermiştir. Bu genin ifadesinin azalmasının patojen duyarlılığı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

WRKY ailesi, DNA bağlanma proteinlerinden, bitkilerdeki en büyük transkripsiyon faktörü ailelerinden birisidir. WRKY transkripsiyon faktörleri yüksek oranda korunmuş N-terminal domaininden oluşmuştur. WRKY transkripsiyon faktörleri bitkilerde çeşitli süreçlerde yer alan hedef genlerin ekspresyonunu düzenlemek için hedef gen promotörünün W-kutusu ile bağlanır. W kutusu, dejenere / çekirdek TGAC motifinden; WRKY proteinleri ile etkileşime giren korunmuş bir GAC çekirdeğinden oluşur ve spesifik WRKY faktörleri tarafından tanınır. WRKY'ler W-kutusu (TTGACT) olarak adlandırılan konsensüs cis elementine bağlanarak bu genlerin savunma ile ilgili ekspresyonunu düzenlerler (161). WRKY'ler çeşitli homo - heterodimer kombinasyonlarıyla aktivatör veya repressör olarak hareket edebilirler. Yapılan çalışmalarda WRKY transkripsiyon faktörlerinin bitkilerde yapısal olarak ifade edilmediği; çeşitli stresler tarafından indüklendiği belirtilmiştir. WRKY transkripsiyon faktörlerinden WRKY6 transkripsiyon faktörünün bitki patojen savunmasına ve yaşlanma sürecine etki ettiği; özellikle bakteriyel enfeksiyonlarda WRKY6'nın PR1 promotörünü pozitif olarak etkilediği bildirilmiştir (162). Başka bir çalışmada WRKY38 ve WRKY62 transkripsiyon faktörlerinin bazı tanımlanamayan düzenleyiciler aracılığı ile bakteriyel patojen *Pseudomonas syringae*'ye karşı savunma tepkisini azaltıcı yönde etki yaptığı açıklanmıştır (163). WRKY33 transkripsiyon faktörü ile yapılan bir çalışmada ise; WRKY33'ün aşırı ifade edilmesinin *Arabidopsis thaliana*'da nektotrofik fungal patojenlere (*Botrytis cinerea* ve *Alternaria brassicicola*) duyarlılığı arttırdığı gösterilmiştir (164). Üzümde yapılan bir çalışmada da fungal patojen enfeksiyonu sonrasında belirlenen 16 WRKY transkripsiyon faktöründen bazılarında azalış olduğu belirtilmiştir (165).

Bu tez çalışmamız sonucunda, ifade edilen genlere baktığımızda protein ID'si XP_015066320.1 olan – WRKY transkription factor 3'ün ana - baba ve hassas F2 - dayanıklı F2 örnekleri arasında ifadesinin sırasıyla 1.4 ve 2.7 kat azaldığı görülmektedir. WRKY transkripsiyon faktörlerine baktığımızda ana - baba ve hassas F2 - dayanıklı F2 arasında ifadesi azalan tek gen varken; 10 tane ifadesi artan ortak gen bulunmaktadır. 'WRKY transcription factor 40 (*S. pennellii*)' proteinini kodlayan ve XP_015084503.1 ID'li genin ifadesinin ana-baba örneklerinde ifadesinin 4.7 kat artarken; hassas F2 -

dayanıklı F2 örneklerinde ifadesinin 7.2 kat arttığı görülmektedir. Protein ID'si XP_006361532 olan – WRKY transkription factor 40 (*S. tuberosum*)'ın ifadesinin de ana - baba'da 9.6 kat artarken; hassas F2 - dayanıklı F2'de 7 kat arttığı, Protein ID'si XP_004252561.2 olan – WRKY transkription factor 51 (*S. lycopersicum*)'ın ifadesinin de ana - baba'da 1.9 kat artarken; hassas F2 - dayanıklı F2'de 4.5 kat arttığı, Protein ID'si XP_006359017.1 olan – WRKY transkription factor 51 (*S. tuberosum*)'un ifadesinin de ana - baba'da 8.4 kat artarken; hassas F2 - dayanıklı F2'de 3.1 kat arttığı, Protein ID'si XP_015064265.1 olan – WRKY transkription factor 6-like (*S. pennellii*)'nin ifadesinin de ana - baba'da 3.6 kat artarken; hassas F2 - dayanıklı F2'de 2.2 kat arttığı, Protein ID'si XP_015080936.1 olan – WRKY transkription factor 71-like (*S. pennellii*)'nin ifadesinin de ana - baba'da 2.1 kat artarken; hassas F2 - dayanıklı F2'de 2.6 kat arttığı, Protein ID'si OIS98026 olan – WRKY transkription factor 70'in ifadesinin de ana - baba'da 2 kat artarken; hassas F2 - dayanıklı F2'de 2.2 kat arttığı, Protein ID'si XP_015072893.1 olan – WRKY transkription factor 51'in ifadesinin de ana - baba'da 1.6 kat artarken; hassas F2 - dayanıklı F2'de 1.9 kat arttığı, Protein ID'si ABU49725.1 olan – WRKY transkription factor 6'nın ifadesinin de ana - baba'da 1.3 kat artarken; hassas F2 - dayanıklı F2'de 1.7 kat arttığı, Protein ID'si XP_006350583.1 olan – WRKY transkription factor 30'un ifadesinin de ana - baba'da 7.1 kat artarken; hassas F2 - dayanıklı F2'de 2.5 kat arttığı görülmektedir. Bu ifadelere baktığımızda WRKY transkripsiyon faktörlerinin genel olarak ifade artışı ile dayanıklılık sağladığı söylenebilir. Bu sonuçlar literatürdeki bilgiler ile de uyusmaktadır.

Virüs, bakteri, fungus, nematod gibi organizmalar bitkileri besin kaynağı olarak görmekte; bu da bitkileri bu patojenlerden gelen saldırılara açık hale getirmektedir. Bitkiler patojenler ile mücadele etmek için zamanla farklı savunma stratejileri geliştirmişlerdir. Bu stratejilerde bazen başarılı olsalar da bazende savunma stratejileri işe yaramamaktadır. Bu başarısızlık sonucunda patojen bitkiye girmekte ve bitkiye zarar vermektedir. Bitkilerin patojenlere karşı oluşturduğu savunma stratejilerinden bazıları PR (patojen ile ilişkili proteinler)'lerdir. PR'lerden bazıları thaumatin, thionin, kitinaz, glukonazdır. Bitkinin patojenlere oluşturduğu yanıtlardan olan peroksidaz; patojenin yayılmasını kısıtlayan yapısal bariyerlerin sentezlenmesinde; kitinaz, glukonaz, pektinaz gibi enzimler ise fungusun hücre duvarının yok edilmesinde görevlidirler (167). Kitinaz, kitin polimerini kitobiyoz dimerlerine hidrolize edebilir, çeşitli organizmalar tarafından üretilir ve biyokontrol sürecine dahil olur (168). Bu tez çalışmasında da çalışılan *Fusarium*

oxysporum melongenae sporla çoğalan bir fungustur. *Fomg*'nin ürettiği spor tiplerinden olan klamidospore kalın hücre duvarları sayesinde toprakta uzun süre yaşamaktadırlar. Mücadele çalışmalarına bakıldığında; *Fusarium*'un farklı bir türü olan *Fusarium solani* ile ilgili yapılan çalışmada; hücre duvarı parçalayıcı kitinaz ve β 1-3 glukonaz enzimi içeren *Trichoderma harzianum* ve *Trichoderma viride* türlerinin bu patojenin varlığını azalttığı belirtilmiştir (109). Çalışma sonucumuzdan elde edilen verilere baktığımızda, kitinaz – endokitinazdan sorumlu genlerden bazılarının ana - baba ve hassas F2 - dayanıklı F2 de ortak artış veya azalış gösterdiği görülmektedir. Ana - baba ve hassas F2 - dayanıklı F2 arasında ortak azalış gösteren bir tane gen bulunmuştur. Bu gen XP-015057138.1 protein ID'li 'chitinase 2-like' proteininden sorumlu gendir ve ana - baba arasında ifadesi 1.5 kat azalmışken; hassas F2 - dayanıklı F2 arasında 1.8 kat azalmıştır. Hassas - dayanıklı örnekler arasında kitin ile alakalı, ortak artış gösteren 5 adet gen bulunmuştur. NCBI nükleotit veri tabanına göre tanımı '*Solanum tuberosum* chitinase-3-like protein 2' olan PHT75397 ID'li proteinden sorumlu genin ifadesi ana baba arasında 8.3 kat artmışken; hassas F2 - dayanıklı F2 arasında 5.2 kat artmıştır. PHT91056.1 ID'li 'Endochitinase' proteininden sorumlu genin ifadesi de sırasıyla 8.2 ve 3 kat artış göstermiştir. Hassas dayanıklı örnekler arasında ifadesi artan bir diğer gen de XP-015076082.1 protein ID'li 'acidic endochitinase' proteininden sorumlu gendir. Bu genin ifadesi de ana - baba arasında 4.9 kat artarken; hassas F2 - dayanıklı F2 arasında 1.8 kat artmıştır. XP-006345574.1 protein ID'li 'acidic endochitinase (*S. tuberosum*)' tanımlı proteinden sorumlu genin ifadesi de sırasıyla 4.1 ve 1.7 kat artış göstermiştir. Protein ID'si PHT91059.1 olan 'acidic endochitinase pcht28 (*Capsicum annuum*)' proteinini ifade eden genin ifadesi de ana - baba örnekleri arasında 4.1 kat artış gösterirken; hassas F2 - dayanıklı F2 örnekleri arasında 1.7 kat artış göstermiştir. Bu sonuçlara baktığımızda bu genlerin gernerasyonlar arasında ortak olması, ifadelerinin genel olarak artış göstermesi patojen ile ilişkili olabilir.

PR'lerden olan thaumatin proteininden sorumlu genlerin hassas - dayanıklı örnekler arasındaki ifade farklarına baktığımızda 2 tane ifadesi azalan ortak gen olduğu görülmektedir. Bu genlerden ilki olan XP-006359673.1 ID'li 'thaumatin-like protein' proteinini ifade eden genin ifadesinin ana - baba arasında 2.1 kat azalırken hassas F2 - dayanıklı F2 arasında 3.6 kat azaldığı, XP-006341532.1 ID'li 'Thaumatin-like protein' proteinin ifade eden genin ifadesinin ana - baba ve hassas F2 - dayanıklı F2 arasında 3.3

kat azaldığı görülmektedir. Thaumatin ile ilişkili bu genlerdeki ifade azalışının sebebi patojen ile ilişkili olabilir.

PR'lerden olan glukonaz enziminden sorumlu genlerin hassas – dayanıklı örnekler arasındaki farklılığa baktığımızda; iki tane ifadesi ortak azalan gen olduğu görülmektedir. Bu genlerden ilki XP-016565793.1 protein ID'li 'endoglucanase17'den sorumlu gendir. Bu genin ifadesi ana – baba ve hassas F2 – dayanıklı F2'de yaklaşık 4 kat azalmıştır. Diğer gen ise PHU28071.1 protein ID'li 'endoglucanase'dan sorumlu gendir ve ifadesi ana – baba ve hassas F2 – dayanıklı F2'de yaklaşık 1.7 kat azalış göstermiştir. Glukonaz ile ilişkili, ifadesi hassas – dayanıklı örneklerde artan gen de protein ID'si XP-006353239.1 olan 'endoglucanase 12'dan sorumlu gendir. Bu genin ifadesi de ana – baba arasında 2.8 kat artmışken; hassas F2 – dayanıklı F2 arasında 7.3 kat artmıştır. Bütün bu genlere baktığımızda glukonaz ile ilişkili genlerin ifadesinin generasyonlar arasında ortak olması bu genlerin patojen ile ilişkili olabileceğini; ifadesindeki artışla veya azalışla patojen dayanıklılığı sağlayabildiği söylenebilir.

Bitki savunması sırasında indüklenen proteinler arasında bitki peroksidazları da bulunmaktadır. Peroksidazlar, geniş bir aileye aittirler ve lignin – suberin oluşumu, hücre duvarı bileşenlerinin çapraz bağlanması ve fitoaleksinlerin sentezi gibi çok çeşitli fizyolojik süreçlere katılırlar (169). Bir çeşit oksido - redüktaz enzimi olan peroksidazlar hücre duvarının yapısına katılarak mantar penetrasyonunu sınırlayarak patojenin hücre içine girmesine engel olmaya çalışırlar. Bu çalışmada peroksidaz ile patojen ilişkisine bakıldığında, ana - baba ve hassas F2 - dayanıklı F2 örnekleri arasında peroksidaz ile ilişkili 6 tane gen bulunmuştur. Bu genlerden 4 tanesinin ifadesi ortak olarak azalış göstermişken; 2 gen artan ifade göstermiştir. İfadesi artan genler: XP-015165683.1 protein ID'li 'cationic peroxidase 1-like' proteininden sorumlu gen ve XP-004249496.1 protein ID'li 'peroxidase 21' proteininden sorumlu gendir. İlk genin ifadesi ana baba arasında 1.2 kat artarken; hassas F2 - dayanıklı F2 arasında 9.3 kat artış göstermiştir. İkinci genin ifadesi ise ana baba arasında 8 kat artış gösterirken hassas F2 - dayanıklı F2 arasında 4.6 kat artış göstermiştir. Peroksidazdan sorumlu 4 tane genin ifadesinin de hassas - dayanıklı örnekler arasında azaldığı görülmektedir. Bu genler: XP-006351920.1 protein ID'li 'lignin-forming anionic peroxidase-like' proteininden sorumlu gen, XP-006367225.1 protein ID'li 'peroxidase 44-like' proteininden sorumlu gen, XP-006342451.1 protein ID'li 'peroxidase 46-like' proteininden sorumlu gen ve PHU12217.1 protein ID'li 'peroxidase 39'

proteininden sorumlu gendir. Peroksidazdan sorumlu genlerin tez çalışmasındaki örneklerde ifade değişimlerine bakıldığında ise patojen dayanıklılığı ile ilişkili olabileceği, ifadelerinin bazı durumlarda artarak bazı durumlarda azalarak patojene dayanıklılık sağladığı söylenebilir.

Fusarium solgunluğuna karşı dayanıklılık çalışmaları çeşitli bahçe bitkilerinde gerçekleştirilmiştir. Domateste moleküler haritalama çalışmaları ile yabancı türlerden (*Solanum pennelli* ve *Solanum pimpinellifolium*) elde edilen I, I1, I2, ve I3 olmak üzere 4 direnç geni belirtilmiştir. Kavunda da kantitatif özellik lokusu (QTL) ile Fom-1, Fom-2, Fom-3, Fom-4 direnç genleri belirtilmiştir (3). Domatesteki I2 ve kavunda bulunan Fom-1 ve Fom-2 genlerinin klonlandığı bir çalışmada her 3 genin de NBS-LRR (nükleotid bağlanma bölgesi - lösine bakımından zengin tekrarlar) bölgelerini içerdiğini tespit etmişlerdir (3, 170-172). Tez çalışmasından elde edilen RNA sekanslama sonuçlarına bakıldığında, lösine zengin tekrar (LRR) bölgeleri ile ilgili proteinleri kodlayan çok sayıda gen bulunduğu görülmektedir. Bu genlere ayrıntılı olarak baktığımızda, farklı seviyelerde artış - azalış gösteren; farklı özelliklerde proteinleri kodlayan genlerin varlığı görülmektedir. Protein ID'si XP-006341184.2 olan 'leucine-rich repeat receptor like protein kinase PXC1' proteininden sorumlu genin ifadesi ana - baba örnekleri arasında 2.6 kat azalmışken; hassas F2 - dayanıklı F2 örnekleri arasında benzer oranda 2.2 kat azalmıştır. İfadesi azalan bir başka gen de Protein ID'si XP-004253264.1 olan 'LRR receptor-like serine/threonine protein kinase At1g34110' proteinini kodlayan gendir. Bu genin ifadesi de ana - baba ve hassas F2 - dayanıklı F2 örneklerinde yaklaşık 3 kat azalmıştır. Protein ID'si XP-006340709.2 olan 'LRR receptor-like serine/threonine protein kinase At4g36180' proteinin kodlayan genin ifadesi de ana - baba örnekleri arasında 1.4, hassas F2 - dayanıklı F2 örnekleri arasında 3 kat azalış göstermiştir. Protein ID'si XP-006358242.1 olan 'leucine rich repeat receptor like protein kinase TDR' proteininden sorumlu gen ile Protein ID'si XP-006343723.1 olan 'LRR receptor like serine/threonine protein kinase' proteininden sorumlu genin ifadesi de ana - baba ve hassas F2 - dayanıklı F2 örnekleri arasında benzer oranda (yaklaşık 2 kat) ifade azalışı göstermiştir. Lösine zengin tekrar bölgeleri ile ilgili proteinleri kodlayan genler arasında ana - baba ve hassas F2 - dayanıklı F2 arasında ifadesi artan genler de vardır. XP-006358717.1 tanımlı 'LRR receptor like serine/threonine protein kinase At3g47570' proteininden sorumlu gen sırasıyla 1 kat ve 3.4 kat artış göstermişken aynı proteinin farklı bir izoformundan sorumlu (XP-006364147.1 tanımlı 'LRR receptor like serine/threonine protein kinase At3g47570

isoform X1) genin ifadesi ana - baba örneklerinde 2.5 kat artmışken hassas F2 - dayanıklı F2 örnekleri arasında 4 kat artış göstermiştir. XP-006364866.1 ID'li 'LRR receptor like serine/threonine protein kinase At4g08850' proteini ve bu proteinin izoformlarını ifade eden genlerin (Protein ID'leri: XP-006354070.1 ve XP-015161129.1) ifadelerinin de ana - baba ve hassas F2 - dayanıklı F2 örneklerinde artış gösterdiği görülmektedir. Bu sonuçlardan; lösince zengin tekrar içeren bölgelerin patlıcanda da *Fusarium oxysporum melongena* patojen dayanıklılığı ile ilgili olabileceği; genin ifadesinin artarak veya azalarak patojen dayanıklılığı sağladığı söylenebilir.

Kinaz; protein fosforilasyonundan sorumlu enzimdir. Protein kinazlar patojen enfeksiyonu sonucunda bitkide oluşan yanıtlarda da önemli rollerdedir. Patojen inokülasyonu sonrasında meydana gelen sinyal moleküllerinin tanınmasında önemli işleve sahiptirler. Kinaz ailesinden mitojen-aktive eden kinazlar (MAPK) bitkide birçok stres faktörü ile aktive olan iletim yolunda görev almaktadır (153). Yapılan bir çalışmada pamuk MAPK-GhMPK20'nin *Fusarium oxysporum* dayanıklılığında negatif düzenleyici olarak görev aldığı bildirilmiştir (154). Bu tez çalışmasında da transkriptom sekanslaması sonucunda elde edilen genlere /Ana - baba ve hassas F2 - dayanıklı F2 örnekleri arasındaki ortak genlere baktığımızda çok sayıda kinaz ile ilişkili gen bulunduğu; bunlardan bir kısmının ifadesinin azalırken bir kısmının arttığı görülmektedir. Bu genlerin hassas-dayanıklı örnekler arasında artış veya azalış göstererek ortak ifade göstermesi patojen ile ilişkilendirilebilir.

Kirola, Major Lateks Proteinlerinden (MLP)' dir. MLP'lerin biyotik ve abiyotik streslere karşı savunma tepkisinde yer aldığı bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada, MLP'lerin *Fusarium oxysporum* ile enfekte olan pamukların kökünde ve hipokotillerinde bol miktarda bulunduğu bildirilmiştir. Kesin işlevi bilinmese de MLP'lerin çeşitli enfeksiyonlar sırasında aşırı eksprese edildikleri bilinmektedir (173). Bu tez çalışmasında MLP'lerden kirola-like proteini; ID'si XP_016574628.1'e baktığımızda bu proteini kodlayan genlerin ifadelerinin değişkenlik gösterdiği, her örnekte ifade edilmediği; patojen dayanıklılığı ile kesin olarak ilişkilendirilemeyeceği söylenebilir.

Pathogenesis related protein STH-2 patatesten izole edilen; patojen ile alakalı gen ailesine ait bir proteindir. STH-2'nin yaralanma, uyarılma ve enfeksiyonlardan sonra çoğu dokuda biriktiği görülmektedir (174). Patatesten fungal patojen *Phytophthora infestans* ile yapılan bir çalışmada patatesten patojene etki olarak STH-2 proteinin daha yüksek seviyelerde

biriktiği görülmektedir (175). Tez çalışmamızın sonuçlarına baktığımızda ID'si XP_006342409.1 olan pathogenesis related protein STH-2-like proteinini ifade eden genin ifadesinin ana – baba örneklerinde 4.1 kat artarken; hassas F2 – dayanıklı F2 örneklerinde 2.9 arttığı görülmektedir. Bu sonuçlardan bu genin ana – baba, hassas – dayanıklı generasyonları arasında korunduğu patojen ile ilişkili olduğu söylenebilir.

Kiwellin, kivi meyvesinden adını alan; çeşitli bitkilerde patojen saldırısı esnasında ifadesi artan bir proteindir. Mısırdaki yapılan bir çalışmada, fungal *Ustilaga maydis* ile enfekte olan bitkide (ZmKWL1) – kiwellin proteinin ifadesinin arttığı gözlenmiştir (176). Tez çalışmasından elde edilen sonuçlardan kiwellin proteinlerine baktığımızda; XP_010313436.1 – kiwellin proteininden sorumlu genin; bazı örneklerde ifadesinin arttığı; bazı örneklerde ise ifadesinin azaldığı, bazı örneklerde de ifade edilmediği görülmektedir. Bu proteinden sorumlu genin ifadesi patojen ile ilişkili olabileceği gibi başka bir faktörle de ilişkili olabilir.

Bu çalışmadaki amacımız; türler arası melezlemeler yapılması; bu melezlemeler ile F2 generasyonuna gitmek; melezlemeler sonucunda dayanıklı bitkiler elde edebilmek, *Fusarium oxysporum melongenae* dayanıklılığının generasyonlar arası geçişini kontrol etmek ve bitkilerin yaprak örneklerinde generasyonlar boyu RNA dizileme analizi yapmak olmuştur. Bu amaçlar doğrultusunda çalışmadan elde edilen sonuçlara göre *Solanum melongena* ve *Solanum macrocarpon* türlerinin başarılı bir şekilde melezlenebildiği; sonraki generasyonlardan (F2) bitki elde edilebildiği görülmektedir. Ayrıca elde edilen bitkilere patolojik testlemeler yapıldığında dayanıklı bitkiler elde edildiği de gözlenmiştir. Çalışmanın sonucunda;

- Bitkilerin yaprak dokularından alınan örneklerden genler belirlenmiş; gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. İfade edilen genlerin generasyonlar arasında ne şekilde ifade edildiği belirlenmiştir.
- Tez çalışması transkriptom düzeyinde hassas - dayanıklı ebeveynlerin genleri ve bunların özellikle F2'lerde kalıtımı ile ilgili önemli sonuçlar ortaya koymuştur.
- 5.10 ve 5.21 arasındaki çizelgelerde ifadesi kayda değer katsayı artış / azalış gösteren genler kültür patlıcanının hassaslık - yabancı patlıcanın dayanıklılık profilini ortaya koyacak aday genler olup aynı zamanda dayanıklılık ıslahında protein düzeyinde fonksiyonel çalışmalara aday genlerdir.

- Patojen dayanıklılığında farklı yollar (Salisilik asit, Jasmonik asit, etilen, transkripsiyon faktörleri vb.) devreye girebilmektedir. Bu çalışmada kullanılan ıslah kombinasyonlarının dayanıklılıkla hangi yolları ön plana çıkardığı diğer bir ifade ile özellikle kullanılan yabancı türün sağladığı dayanıklılığın, hassas türden kaynaklanan hassaslığın ön bulguları elde edilmiştir. Bu kapsamda;

Etilenle ilgili tartışılan genlerin hassas – dayanıklı örneklerde ortak olarak bulunması, generasyonlar arasında korunması bu genlerin patojen ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.

WRKY transkripsiyon faktörlerine ait genlerin hassas – dayanıklı örneklerde ortak olması, generasyonlar boyunca korunması patojen ile ilişkilendirilebilir; genlerin genel olarak azalan ifade göstermesi patojen dayanıklılığı ile ilgili olabileceğini göstermektedir.

Kitin ilgili tartışılan genlerin ana – baba arasında ve hassas – dayanıklı generasyonları arasında korunması bu genlerin patojen ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Thaumatokorin proteinleri ile ilişkili genlerin ifadesinin hassas – dayanıklı örneklerde ifade azalışı ile patojen dayanıklılığı sağladığı söylenebilir.

Glukonaz enzimi ile ilişkili genlerin ifadesinin hassas – dayanıklı örneklerin bazılarında artış bazılarında ifade azalışı göstererek patojen dayanıklılığı ile ilişkili olduğu söylenebilir.

Peroksidaz enzimi ile ilişkili genlerin hassas – dayanıklı örneklerin bazılarında artış göstererek bazılarında da ifade azalışı ile patojen dayanıklılığı ile ilişkili olabileceği görülmektedir.

Lösence zengin tekrar içeren bölgeleri kodlayan genlerin hassas – dayanıklı örneklerin bazılarında artış göstererek bazılarında da ifade azalışı ile patojen dayanıklılığı ile ilişkili olabileceği görülmektedir.

Patojen ilişkili STH2 proteinin kodlayan genlerin hassas – dayanıklı örneklerde ifade artışı ile patojen dayanıklılığı sağladığı söylenebilir.

- Günümüzde MAS (marker asisted selection) çalışmaları baskın kalıtım gösteren genlere dayalı olarak yürütülmektedir. Klasik QTL (Quantitative Trait locus) haritalama çalışması ile tespit edilen genle ilişkili markırların fragment amplifikasyonu ile yapılan MAS değerlendirmeleri ise baskın / çekinik allel ayrımındaki yetersizliklerden dolayı etkin kullanılamamaktadır. Bu çalışma ile ebeveynden - F2 generasyonuna kadar kalıtımı kanıtlanan genlerden ıslahta dayanıklı allel seçimi (baba orijinli genlerden, AA, Aa gibi) veya ıslahta hassas allel eliminasyonu (ana orijinli genlerden, aa) sağlayan SNP tabanlı markırlar geliştirilebilecektir.
- MAS çalışmalarının etkinliğinde en önemli olan unsurlardan birisi ise kullanılan haritalama popülasyonlarıdır. Bir popülasyondan geliştirilen markırlar ıslah ebeveyn farklılıklarından dolayı diğer bir popülasyonda işlevsel olamamaktadır. Özellikle türler arası melezlemede zorluklar, dayanımın poligenik olabilmesi gibi nedenlerden dolayı her bir popülasyon için de genetik haritalar oluşturulamamaktadır. Bu tez çalışması ile F2 aşamasına kadar ifade - kalıtımı ortaya konulan genlerle *Solanum macrocarpon* türü için ıslahta markır geliştirmeye yönelik kullanılabilecek bir veri tabanı ilk olarak oluşturulmuştur.
- Ayrıca tezde tespit edilen yaprak verileri hastalığın görüldüğü meyve gibi dokularından yapılacak RNA dizileme verileri ile karşılaştırmalı genomik çalışmalara temel oluşturarak dokular arasında karşılaştırmaların yapılmasına; dolayısıyla transkriptom profilinin zenginleştirilmesine olanak sağlayacaktır.
- Çalışmanın sonucunda elde edilen transkriptom verileri; patlıcanda türler arası melezleme çalışmaları yapan, patlıcanda *Fusarium oxysporum melongenae* dayanıklılığı çalışan ıslahçıların araştırmalarına yol gösterici olabilir.

KAYNAKLAR

1. Daunay M-C. Eggplant. Vegetables II: Springer; 2008. p. 163-220.
2. Baysal O, Siragusa M, Gumrukcu E, Zengin S, Carimi F, Sajeva M, et al. Molecular Characterization of *Fusarium oxysporum* f. *melongenae* by ISSR and RAPD Markers on Eggplant. *Biochem Genet.* 2010;48(5-6):524-37. doi: 10.1007/s10528-010-9336-1. PubMed PMID: WOS:000277425600015.
3. Miyatake K, Saito T, Negoro S, Yamaguchi H, Nunome T, Ohyama A, et al. Detailed mapping of a resistance locus against *Fusarium* wilt in cultivated eggplant (*Solanum melongena*). *Theoretical and applied genetics.* 2016;129(2):357-67.
4. Altınok HH, CAN C, Dikilitaş M, Çolak H. Türkiye’de Açık Tarla Patlıcan Yetiştiriciliğinde *Fusarium* Solgunluk Hastalığının Yaygınlığı ve İzolatların Virülenslikleri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi.* 16(3):342-52.
5. Vorontsova MS, Stern S, Bohs L, Knapp S. African spiny *Solanum* (subgenus *Leptostemonum*, *Solanaceae*): a thorny phylogenetic tangle. *Botanical Journal of the Linnean Society.* 2013;173(2):176-93.
6. Daunay M, Lester R. The usefulness of taxonomy for *Solanaceae* breeders, with special reference to the genus *Solanum* and to *Solanum melongena* L.(eggplant). 1988.
7. Chapman MA. Introduction: The Importance of Eggplant. Chapman MA, editor: Springer; 2019.
8. Kashyap A, Weber S. Starch grain analysis and experiments provide insights into Harappan cooking practices. *Connections and Complexity: Routledge;* 2016. p. 177-94.
9. Knapp S, Chase MW, Clarkson JJ. Nomenclatural changes and a new sectional classification in *Nicotiana* (*Solanaceae*). *Taxon.* 2004;53(1):73-82.
10. Dupin J, Matzke NJ, Särkinen T, Knapp S, Olmstead RG, Bohs L, et al. Bayesian estimation of the global biogeographical history of the *Solanaceae*. *Journal of Biogeography.* 2017;44(4):887-99.
11. Vorontsova MS, Knapp S. A Revision of the" Spiny *Solanums*," *Solanum* Subgenus *Leptostemonum* (*Solanaceae*), in Africa and Madagascar. *Systematic Botany Monographs.* 2016:1-432.
12. Weese TL, Bohs L. Eggplant origins: out of Africa, into the Orient. *Taxon.* 2010;59(1):49-56.

13. Sandra Knapp XAaJP. Eggplant (*Solanum melongena* L.):
Taxonomy and Relationship. In: Chapman MA, editor. *The Eggplant Genome*: Springer; 2019. p. 11-22.
14. Şekara A, Cebula S, Kunicki E. Cultivated eggplants—origin, breeding objectives and genetic resources, a review. *Folia Horticulturae*. 2007;19(1):97-114.
15. Sakata Y, Lester RN. Chloroplast DNA diversity in brinjal eggplant (*Solanum melongena* L.) and related species. *Euphytica*. 1997;97(3):295-301.
16. Karihaloo J, Brauner S, Gottlieb L. Random amplified polymorphic DNA variation in the eggplant, *Solanum melongena* L.(Solanaceae). *Theoretical and Applied Genetics*. 1995;90(6):767-70.
17. Singh A, Singh R, Kumar S, Kalloo G. Genetic diversity within the genus *Solanum* (Solanaceae) as revealed by RAPD markers. *Current science*. 2006;711-6.
18. Karihaloo J, Kaur M, Singh S. Seed protein diversity in *Solanum melongena* L. and its wild and weedy relatives. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2002;49(6):533-9.
19. Furini A, Wunder J. Analysis of eggplant (*Solanum melongena*)-related germplasm: morphological and AFLP data contribute to phylogenetic interpretations and germplasm utilization. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004;108(2):197-208.
20. Bukenya Z, Carasco J. *Solanum* (solanaceae) in Uganda. *Bothalia*. 1995;25(1):43-59.
21. Aubriot X, Singh P, Knapp S. Tropical Asian species show that the Old World clade of ‘spiny solanums’(*Solanum* subgenus *Leptostemonum* pro parte: Solanaceae) is not monophyletic. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2016;181(2):199-223.
22. Lester R, Niakan L. Origin and domestication of the scarlet eggplant, *Solanum aetbiopicum*, from *S. anguivi* in Africa. Columbia University Press, 1986.
23. Doganlar S, Frary A, Daunay M-C, Lester RN, Tanksley SD. A comparative genetic linkage map of eggplant (*Solanum melongena*) and its implications for genome evolution in the Solanaceae. *Genetics*. 2002;161(4):1697-711.
24. Daunay M-C. Solanaceae Genetic Resources in Europe: Report of Two Meetings 21 September 2001, Nijmegen, The Netherlands; 22 May 2003, Skierniewice, Poland: Bioversity International; 2003.
25. Frary A DS, Daunay M. Eggplant. *Vegetables*: Springer; 2007. p. 287-313.
26. Kashyap V, Kumar SV, Collonnier C, Fusari F, Haicour R, Rotino G, et al. Biotechnology of eggplant. *Scientia Horticulturae*. 2003;97(1):1-25.

27. Zaro MJ, Keunchkarian S, Chaves AR, Vicente AR, Concellón A. Changes in bioactive compounds and response to postharvest storage conditions in purple eggplants as affected by fruit developmental stage. *Postharvest Biology and Technology*. 2014;96:110-7.
28. Davis PH. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol. 3. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands Vol 3*. 1970.
29. Ceylan D. Halk Arasında Hemoroide Karşı Kullanılan *Solanum Melongena* L. Bitkisi Üzerinde Farmokognozik Araştırmalar: Gazi Üniversitesi; 2019.
30. Günay A. Özel sebze yetiştiriciliği. Cilt V Ankara. 1992.
31. Cardoso MO, de Oliveira AP, Pereira WE, de Souza AP. Growth, nutrition and yield of eggplant as affected by doses of cattle manure and magnesium thermophosphate plus cow urine. *Horticultura Brasileira*. 2009;27(3):307-13.
32. Meyer RS, Bamshad M, Fuller DQ, Litt A. Comparing medicinal uses of eggplant and related Solanaceae in China, India, and the Philippines suggests the independent development of uses, cultural diffusion, and recent species substitutions. *Economic botany*. 2014;68(2):137-52.
33. Caruso G, Pokluda R, Şekara A, Kalisz A, Jezdinsky A, Kopta T, et al. Agricultural practices, biology and quality of eggplant cultivated in Central Europe. A review. *Horticultural Science*. 2017;44(4):201-12.
34. Wang J-X, Gao T-G, Knapp S. Ancient Chinese literature reveals pathways of eggplant domestication. *Annals of botany*. 2008;102(6):891-7.
35. Meyer RS, Whitaker BD, Little DP, Wu S-B, Kennelly EJ, Long C-L, et al. Parallel reductions in phenolic constituents resulting from the domestication of eggplant. *Phytochemistry*. 2015;115:194-206.
36. Mennella JA, Trabulsi JC. Alimentos complementarios y experiencias de sabor: estableciendo las bases. *Ann Nutr Metab*. 2012;60(Suppl 2):40-50.
37. D S. Marker assisted backcross breeding for fusarium wilt (*fusarium oxysporum* schlecht. F. Sp. *Melongenae*) in eggplant: Akdeniz University; 2019.
38. Arivalagan M, Gangopadhyay K, Kumar G, Bhardwaj R, Prasad T, Sarkar SK, et al. Variability in mineral composition of Indian eggplant (*Solanum melongena* L.) genotypes. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2012;26(1-2):173-6.

39. Güneş S, Savran A, Paksoy MY, Koşar M, Çakılcıoğlu U. Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Karaisalı and its surrounding (Adana-Turkey). Journal of herbal medicine. 2017;8:68-75.
40. Warriar P, Nambiar V, Ramankutty C. Indian medicinal plants: a compendium of 500 species: Orient Longman Ltd. Chennai. 1996;3:38-90.
41. TÜİK. Türkiye İstatistik Kurumu 2018 [cited 2020].
42. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. [cited 2020]. Available from: <http://faostat.fao.org>
43. Keatinge J, Lin L-J, Ebert A, Chen W, Hughes JA, Luther G, et al. Overcoming biotic and abiotic stresses in the Solanaceae through grafting: current status and future perspectives. Biological agriculture & horticulture. 2014;30(4):272-87.
44. Rotino GL, Perri E, Zottini M, Sommer H, Spena A. Genetic engineering of parthenocarpic plants. Nature biotechnology. 1997;15(13):1398-401.
45. [cited 2021 05.03.2021]. Available from: <https://www.seminis-us.com/>.
46. Alam I, Salimullah M. Genetic engineering of eggplant (*Solanum melongena* L.): Progress, controversy and potential. Horticulturae. 2021;7(4):78.
47. Akinci I, Akinci S, Yilmaz K, Dikici H. Response of eggplant varieties (*Solanum melongena*) to salinity in germination and seedling stages. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. 2004;32(2):193-200.
48. Yetişir H, Yarşi G, Sarı N. Sebzelerde aşılama. Bahçe. 2004;33(1).
49. Balaz F. Possibilities of grafting certain watermelon cultivars on *Lagenaria vulgaris* to prevent *Fusarium* wilt. Sauvemenia Poljoprivreda. 1982;30:563-8.
50. Chouka A, Jebari H, editors. Effect of grafting on watermelon vegetative and root development, production and fruit quality. I International Symposium on Cucurbits 492; 1997.
51. Pogonyi A, Pék Z, Helyes L, Lugasi A. Effect of grafting on the tomato's yield, quality and main fruit components in spring forcing. Acta Alimentaria. 2005;34(4):453-62.
52. Polat E. Aşılı Patlıcanda verim, kalite ve toprak kökenli hastalıklar (*Fusarium oxysporium* f. sp. *melonis* ve *Verticillium dahlia*) üzerine farklı anaçların etkisi: Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi; 2021.
53. Yılmaz S, Çelik İ, Boyacı F, Yeşilova Ö. Aşılı domates fide üretiminde kullanılan *Solanum torvum*'un *Fusarium oxysporium* f. sp. *melongena*'ya karşı reaksiyonları ve anaç performansının belirlenmesi. II. Tohumculuk Kongresi. 2005;9(11).

54. Johnson S, Inglis D, Miles C. Grafting effects on eggplant growth, yield, and verticillium wilt incidence. *International Journal of Vegetable Science*. 2014;20(1):3-20.
55. Boyacı H, Ellialtıoğlu S, editors. Rootstock usage in eggplant: Actual situation and recent advances. XXX International Horticultural Congress IHC2018: III International Symposium on Innovation and New Technologies in Protected 1271; 2018.
56. Çürük S, Dayan A. *Solanum melongena* ve *Solanum torvum*'un türler arası melezlerinin morfolojik özellikleri. *Mediterranean Agricultural Sciences*. 2017;30(3):179-88.
57. Collonnier C, Fock I, Kashyap V, Rotino G, Daunay M, Lian Y, et al. Applications of biotechnology in eggplant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2001;65(2):91-107.
58. Külahlıoğlu İ. Patlıcanda Türler Arası Melezleme (*Solanum melongena* L. x *Solanum torvum*) Engelinin Aşılması Üzerine Araştırmalar: Mustafa Kemal Üniversitesi; 2019.
59. Sharma S, Sharma A, Katoch V. Biotechnological interventions in eggplant (*Solanum melongena* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 2020;95(3):273-85.
60. Toppino L, Valè G, Rotino GL. Inheritance of Fusarium wilt resistance introgressed from *Solanum aethiopicum* Gilo and *Aculeatum* groups into cultivated eggplant (*S. melongena*) and development of associated PCR-based markers. *Molecular Breeding*. 2008;22(2):237-50.
61. Rizza F, Mennella G, Collonnier C, Sihachakr D, Kashyap V, Rajam M, et al. Androgenic dihaploids from somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. aethiopicum* group gilo as a source of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*. *Plant cell reports*. 2002;20(11):1022-32.
62. Collonnier C, Fock I, Mariska I, Servaes A, Vedel F, Siljak-Yakovlev S, et al. GISH confirmation of somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. torvum*: assessment of resistance to both fungal and bacterial wilts. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2003;41(5):459-70.
63. Liu J, Zheng Z, Zhou X, Feng C, Zhuang Y. Improving the resistance of eggplant (*Solanum melongena*) to *Verticillium* wilt using wild species *Solanum linnaeanum*. *Euphytica*. 2015;201(3):463-9.
64. Barbierato V, Toppino L, Rinaldi P, Sala T, Bassolino L, Valè G, et al. Phenotype and gene expression analyses of the Rfo-sal resistant aubergine interaction with *Fusarium*

- oxysporum f. sp. melongenae and Verticillium dahliae. Plant Pathology. 2016;65(8):1297-309.
65. HoRIE Y. New Summer Crop Cultivars (I): New Cultivars Registered by the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries in 1984. Japanese Journal of Breeding. 1985;35(1):80-3.
66. Schaff DA, Jelenkovic G, Boyer C, Pollack B. Hybridization and fertility of hybrid derivatives of Solatium melongena L. and Solanum macrocarpon L. Theoretical and Applied Genetics. 1982;62(2):149-53.
67. Oyelana O, Ugborogho R. Phenotypic variation of F1 and F2 populations from three species of Solanum L.(Solanaceae). African Journal of Biotechnology. 2008;7(14).
68. Gowda P, Shivashankar K, Joshi S. Interspecific hybridization between Solanum melongena and Solanum macrocarpon: study of the F1 hybrid plants. Euphytica. 1990;48(1):59-61.
69. Marie-Christine Daunay JS, Aubriot aX. Crossability and Diversity of Eggplants and Their Wild Relatives. In: Chapman MA, editor. The Eggplant Genome: Springer; 2019.
70. Boyacı H, Abak K. Patlıcanlarda Fusarium solgunluğuna dayanıklılık kaynakları ve dayanıklılığın kalıtımı. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 96s. 2007.
71. Gordon TR. Fusarium oxysporum and the Fusarium wilt syndrome. Annual review of phytopathology. 2017;55:23-39.
72. Semra C, Erberk G, Çalış Ö. Amerika domates genetik kaynakları merkezinden temin edilen domates hatlarının Fusarium etmenlerine karşı dayanıklılık reaksiyonlarının belirlenmesi. Mediterranean Agricultural Sciences.33(3):341-6.
73. Fravel D, Olivain C, Alabouvette C. Fusarium oxysporum and its biocontrol. New phytologist. 2003;157(3):493-502.
74. Singleton LL, Mihail JD, Rush CM. Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi1992.
75. Puhalla JE. Classification of strains of Fusarium oxysporum on the basis of vegetative compatibility. Canadian Journal of Botany. 1985;63(2):179-83.
76. Katan T. Current status of vegetative compatibility groups in Fusarium oxysporum. Phytoparasitica. 1999;27(1):51-64.

77. Baayen RP, O'Donnell K, Bonants PJ, Cigelnik E, Kroon LP, Roebroeck EJ, et al. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. *Phytopathology*. 2000;90(8):891-900.
78. O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(5):2044-9.
79. O'Donnell K, Cigelnik E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular phylogenetics and evolution*. 1997;7(1):103-16.
80. Michielse CB, Rep M. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology*. 2009;10(3):311.
81. Di Pietro A, García-Maceira FI, Meglecz E, Roncero MIG. A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Molecular microbiology*. 2001;39(5):1140-52.
82. Bolwerk A, Lagopodi AL, Lugtenberg BJ, Bloemberg GV. Visualization of interactions between a pathogenic and a beneficial *Fusarium* strain during biocontrol of tomato foot and root rot. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2005;18(7):710-21.
83. Nahalkova J, Fatehi J, Olivain C, Alabouvette C. Tomato root colonization by fluorescent-tagged pathogenic and protective strains of *Fusarium oxysporum* in hydroponic culture differs from root colonization in soil. *FEMS microbiology letters*. 2008;286(2):152-7.
84. Olivain C, Humbert C, Nahalkova J, Fatehi J, l'Haridon F, Alabouvette C. Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil. *Applied and environmental microbiology*. 2006;72(2):1523-31.
85. Lagopodi AL, Ram AF, Lamers GE, Punt PJ, Van den Hondel CA, Lugtenberg BJ, et al. Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2002;15(2):172-9.

86. Di Pietro A, Madrid MP, Caracul Z, Delgado-Jarana J, Roncero MIG. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Mol Plant Pathol*. 2003;4(5):315-25.
87. Beckman CH. The nature of wilt diseases of plants: APS press; 1987.
88. VanEtten HD, Mansfield JW, Bailey JA, Farmer EE. Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus "phytoanticipins". *The Plant Cell*. 1994;6(9):1191.
89. Roddick JG. Subcellular localization of steroidal glycoalkaloids in vegetative organs of *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry*. 1977;16(6):805-7.
90. Keukens EA, de Vrije T, Fabrie CH, Demel RA, Jongen WM, de Kruijff B. Dual specificity of sterol-mediated glycoalkaloid induced membrane disruption. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1992;1110(2):127-36.
91. van der Does HC, Duyvesteyn RG, Goltstein PM, van Schie CC, Manders EM, Cornelissen BJ, et al. Expression of effector gene SIX1 of *Fusarium oxysporum* requires living plant cells. *Fungal Genetics and Biology*. 2008;45(9):1257-64.
92. Baysal Ö, Siragusa M, Gümrükcü E, Zengin S, Carimi F, Sajeve M, et al. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. *melongenae* by ISSR and RAPD markers on eggplant. *Biochemical genetics*. 2010;48(5):524-37.
93. Mutlu N, Boyacı FH, Göçmen M, Abak K. Development of SRAP, SRAP-RGA, RAPD and SCAR markers linked with a *Fusarium* wilt resistance gene in eggplant. *Theoretical and Applied Genetics*. 2008;117(8):1303.
94. Altınok HH, Can C, Boyacı HF, Topcu V. Genetic variability among breeding lines and cultivars of eggplant against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* from Turkey. *Phytoparasitica*. 2014;42(1):75-84.
95. Altınok H. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Patlıcanda *Fusarium* Solgunluğu Hastalığı (*Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *melongenae* Matuo and Ishigami)'nın Yaygınlığı, Etmenin Moleküler Karakterizasyonu ve Bitkide Hastalığa Karşı Dayanıklılığın Uyarılması.: Çukurova Üniversitesi; 2006.
96. ÖZGEN T. PATLICAN (*Solanum melongena* L.) GENOTİPLERİNİN *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*'ya DAYANIKLILIK DÜZEYLERİNİN VE KÖK YAPILARININ İNCELENMESİ: Ondokuz Mayıs Üniversitesi; 2019.

97. Türkteş M, Koral AÖ. Patlıcanda *Fusarium solgunluğuna* dayanıklılık ve mücadele çalışmaları. Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi. 2018;33(1):111-24.
98. Altınok H. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Patlıcanda *Fusarium Solgunluğu* Hastalığı (*Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *melongenae* Matuo and Ishigami)'nın Yaygınlığı, Etmenin Moleküler Karakterizasyonu ve Bitkide Hastalığa Karşı Dayanıklılığın Uyarılması. Tez (Doktora)--Çukurova Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Adana. 2006.
99. Altınok HH, Can C, Boyacı HF, Topcu V. Genetic variability among breeding lines and cultivars of eggplant against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* from Turkey. Phytoparasitica. 2014;42(1):75-84. doi: 10.1007/s12600-013-0340-y. PubMed PMID: WOS:000336842600010.
100. Altınok HH, Canan C, Dikilitaş M, Çolak H. Türkiye'de Açık Tarla Patlıcan Yetiştiriciliğinde *Fusarium Solgunluk* Hastalığının Yaygınlığı ve İzolatların Virülenslikleri. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 2012;16(3):342-52.
101. Gousset C, Collonnier C, Mulya K, Mariska I, Rotino GL, Besse P, et al. *Solanum torvum*, as a useful source of resistance against bacterial and fungal diseases for improvement of eggplant (*S. melongena* L.). Plant Science. 2005;168(2):319-27.
102. Yamakawa K, Mochizuki H. Nature and inheritance of *Fusarium*-wilt resistance in eggplant cultivars and related wild *Solanum* species. Yasai Shikenjo hokoku= Bulletin of the Vegetable and Ornamental Crops Research Station Series A. 1979.
103. Abdullaheva K, Shifman I. Resistance of eggplant to *fusarium* wilt. Seleksiya i Semenovodstvo. 1988;1:29-31.
104. Monma S, Sato T, Matsunaga H. Evaluation of resistance to bacterial, *Fusarium* and *Verticillium* wilt in eggplant and eggplant-related species collected in Ghana. Capsicum Eggplant Nwsl. 1996;15:71-2.
105. Mdee LK, Masoko P, Eloff JN. The activity of extracts of seven common invasive plant species on fungal phytopathogens. South African Journal of Botany. 2009;75(2):375-9.
106. Mahlo SM, McGaw L, Eloff J. Antifungal activity and cytotoxicity of isolated compounds from leaves of *Breonadia salicina*. Journal of ethnopharmacology. 2013;148(3):909-13.
107. Chakraborty M, Chatterjee N. Control of *fusarium* wilt of *Solanum melongena* by *Trichoderma* spp. Biologia plantarum. 2008;52(3):582-6.

108. Jarl C, Rietveld E, De Haas J. Transfer of fungal tolerance through interspecific somatic hybridisation between *Solanum melongena* and *S. torvum*. Plant cell reports. 1999;18(9):791-6.
109. Chen N, Yu B, Dong R, Lei J, Chen C, Cao B. RNA-Seq-derived identification of differential transcription in the eggplant (*Solanum melongena*) following inoculation with bacterial wilt. Gene. 2018;644:137-47.
110. Tutar FK. Patlıcanda Solgunluk Hastalıkları (*Verticillium dahliae* ve *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*)' na Karşı Mikorizal Fungusların ve Abiyotik Uyarıcıların Etkilerinin Belirlenmesi: Çukurova Üniversitesi; 2014.
111. Özaktan H, Aysan Y, Yıldız F, Kınay P. Fitopatolojide biyolojik mücadele. Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi. 2010;1(1):61-78.
112. Ulaş F, Yetişir H. Sebzelelerde Aşılama: Tarihçesi, Kullanımı, Dünyadaki ve Türkiye' deki Gelişimi. Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi.5:345-54.
113. Klug S, Cummings M, Spencer A. Concepts of Genetics, Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey. 2000.
114. Bolukbasi E, Aras ES. Third generation DNA sequencing technologies. DNA. 2015;1(3).
115. Darcan C, Türkyılmaz O. Yeni Nesil Dizileme Teknolojisine Genel Bakış. Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi. 2018;5(1):41-9.
116. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the national academy of sciences. 1977;74(12):5463-7.
117. Doğan M, Eröz R, Yüce H, Özmerdivenli R. Yeni Nesil Dizileme (YND) Hakkında Bilinenler (Literatür Taraması). Duzce Medical Journal. 2017;19(1):27-30.
118. Buermans H, Den Dunnen J. Next generation sequencing technology: advances and applications. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. 2014;1842(10):1932-41.
119. Türктаş M, Kurtoğlu KY, Dorado G, Zhang B, Hernandez P, Ünver T. Sequencing of plant genomes? a review. Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 2015;39(3):361-76.
120. Üstek D, Abacı N, Sırma S, Çakiris A. Yeni nesil DNA dizileme. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi. 2011;1(1):11-8.
121. Van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. Trends in genetics. 2014;30(9):418-26.

122. Metzker ML. Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetics*. 2010;11(1):31-46.
123. Akyol İ, Yıldız MA, Tutar E. Yeni Nesil Nükleotid Dizileme Metotlarının Biyokimyasal Temelleri. *KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi*. 2017;20(1):1-15.
124. Dönmez D, Şimşek Ö, Kaçar YA. Yeni nesil DNA dizileme teknolojileri ve bitkilerde kullanımı. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*. 2015(1):30-7.
125. Sarıman M, Ekmekci SS, Abacı N, Çakiris A, Paçal F, Emrence Z, et al. Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi ile Transkriptom Analizi. *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 5(10):51-9.
126. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics*. 2009;10(1):57-63.
127. Varshney RK, Tuberosa R. Genomics-assisted crop improvement: volume 1, genomics approaches and platforms: Dordrecht: Springer; 2007.
128. Canbulat O. Hacıhaliloğlu Kayısı (*Prunus armeniaca*) çeşidinde transkriptom analizi [Yüksek Lisans Tezi]: Erciyes Üniversitesi; 2019.
129. Ziplar ÜT, Cansaran-Duman D, Türктаş M. Genomic and Transcriptomic Sequencing and Analysis Approaches. *Middle Black Sea Journal of Health Science*. 2018;4(1):34-42.
130. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*. 2021;82(11):801-11.
131. Özmen CY. Asmada Kök Stras Transkriptomlarının Belirlenmesine Yönelik Mikrodizin Analizleri: Ankara Üniversitesi; 2015.
132. Yang X, Cheng Y-F, Deng C, Ma Y, Wang Z-W, Chen X-H, et al. Comparative transcriptome analysis of eggplant (*Solanum melongena* L.) and turkey berry (*Solanum torvum* Sw.): phylogenomics and disease resistance analysis. *Bmc Genomics*. 2014;15(1):1-13.
133. Gramazio P, Blanca J, Ziarsolo P, Herraiz F, Plazas M, Prohens J, et al. Transcriptome analysis and molecular marker discovery in *Solanum incanum* and *S. aethiopicum*, two close relatives of the common eggplant (*Solanum melongena*) with interest for breeding. *Bmc Genomics*. 2016;17(1):1-17.
134. Wei Q, Du L, Wang W, Hu T, Hu H, Wang J, et al. Comparative transcriptome analysis in eggplant reveals selection trends during eggplant domestication. *International Journal of Genomics*. 2019;2019.

135. Xiao XO, qiu Lin W, Li K, Feng XF, Jin H, feng Zou H. Transcriptome analyses reveal anthocyanin biosynthesis in eggplants. *PeerJ Preprints*, 2018 2167-9843.
136. Chen X, Zhang M, Tan J, Huang S, Wang C, Zhang H, et al. Comparative transcriptome analysis provides insights into molecular mechanisms for parthenocarpic fruit development in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plos One*. 2017;12(6):e0179491.
137. Altınok HH, Can C. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* isolates from eggplant in Turkey by pathogenicity, VCG and RAPD analysis. *Phytoparasitica*. 2010;38(2):149-57.
138. Gordon T, Okamoto D, Jacobson D. Colonization of muskmelon and nonsusceptible crops by *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* and other species of *Fusarium*. *Phytopathology*. 1989;79(10):1095-100.
139. Zink F, Gubler W. Inheritance of resistance to races 0 and 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* in a gynoeocious muskmelon. *Plant disease (USA)*. 1986.
140. Yeşilova O, Karaca G, editors. Determination of the effects of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth and *Fusarium* wilt of melon plants. III Balkan Symposium on Vegetables and Potatoes 729; 2004.
141. Baysal Ö, Siragusa M, Gümrükcü E, Zengin S, Carimi F, Sajeva M, et al. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. *melongenae* by ISSR and RAPD markers on eggplant. *Biochemical genetics*. 2010;48(5):524-37.
142. Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature biotechnology*. 2011;29(7):644-52.
143. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics*. 2011;12(1):1-16.
144. Storey JD, Tibshirani R. SAM thresholding and false discovery rates for detecting differential gene expression in DNA microarrays. *The analysis of gene expression data*: Springer; 2003. p. 272-90.
145. Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome biology*. 2010;11(2):1-12.
146. Kanehisa M, Araki M, Goto S, Hattori M, Hirakawa M, Itoh M, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic acids research*. 2007;36(suppl_1):D480-D4.

147. Mao X, Cai T, Olyarchuk JG, Wei L. Automated genome annotation and pathway identification using the KEGG Orthology (KO) as a controlled vocabulary. *Bioinformatics*. 2005;21(19):3787-93.
148. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*. 2003;13(11):2498-504.
149. Jiang L, Schlesinger F, Davis CA, Zhang Y, Li R, Salit M, et al. Synthetic spike-in standards for RNA-seq experiments. *Genome research*. 2011;21(9):1543-51.
150. Morgil H. Kuraklık Stresi Uygulanmış Mercimek (*Lens culinaris* Medik.) Bitkisinin RNA Dizileme Yöntemi ile Transkripsiyonel Analizi: İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2019.
151. Davidson NM, Oshlack A. Corset: enabling differential gene expression analysis for de novo assembled transcriptomes. *Genome biology*. 2014;15(7):1-14.
152. Warden CD, Yuan Y-C, Wu X. Optimal calculation of RNA-Seq fold-change values. *International Journal of Computational Bioinformatics and In Silico Modeling*. 2013;2(6):285-92.
153. Esra K, ÜSTÜN AS. Bitkilerde protein kinazların rolü. *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*. 2011;20(1):25-34.
154. Wang C, He X, Li Y, Wang L, Guo X, Guo X. The cotton MAPK kinase GhMPK20 negatively regulates resistance to *Fusarium oxysporum* by mediating the MKK4–MPK20–WRKY40 cascade. *Molecular plant pathology*. 2018;19(7):1624-38.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Merve Dilek KARATAŞ

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Tokat Gazi Osman Paşa Lisesi

Lisans: Ondokuz Mayıs Üniversitesi/ Ziraat Fakültesi/Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü

Yüksek Lisans: Yüzüncü Yıl Üniversitesi/Tarımsal Biyoteknoloji (2014-2016)

İş Tecrübesi:

Kurumu: Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi

Görevi: Araştırma Görevlisi

Yılları: 2014-Devam ediyor

Yayınlar ve Bildiriler

SCI-SSCI veya SCI Expanded Kapsamındaki Yayınlar

1- Furan Mehmet Alp, Yıldız Mehtap, Karataş Merve Dilek, Chung Yong Suk (2022). Phylogenetic inference and secondary structure predictions of Turkish genotypes of *Coriandrum sativum* (L.) based on ITS4 and ITS5 nrDNA sequences. *Plant Biotechnology Reports*. 2022; (4): 1-12.

2- Karataş Merve Dilek, Hazrati Nahid, Yüksel Özmen Canan, Altıntaş Serdar, Akçay Mehmet Emin, Ergül Ali (2021). Identification of S-Allele Based Self incompatibility of Turkish Pear Gene Resources. *Tarım Bilimleri Dergisi*, Doi: 10.15832/ankutbd.823872 (Yayın No: 7703698)

3- Oğuz Muhammed Çağrı, Geboloğlu Merve Dilek, Oğuz Ezgi, Muhtaba Muhammed, Altıntaş Serdar, Ergül Ali (2021). The comparison of Regeneration from Root Node Explants In solanaceae. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2021; 30(5): 1-10.

4- Furan Mehmet Alp, Geboloğlu Merve Dilek (2017). Bazı Türk Kişniş (*Coriandrum Sativum* L.) Çeşitlerinde Genetik Çeşitliliğin ISSR ve SRAP Markörleri Yardımıyla

Değerlendirilmesi. Two Different Molecular Markers (ssr and ipbs) assessment on coriandrum sativum L. With capillary electrophoresis. Fresenius Environmental Bulletin. 2017; 26(7): 4568-4573.

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1- Koçak Metin, Geboloğlu Merve Dilek, Alp Şevket, Baloch Faheem Shehzad, Yıldız Mehtap (2020). Van Gölü Havzasından Toplanan Terslale (*Fritillaria imperialis* L.) Genotiplerinde Genetik Farklılığın iPBS Retrotranspozon Markırları ile Belirlenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi. 2020; 30(2):398-406.

2- Akpınar Ali Emre, Altıntaş Serdar, Altunok Sümeyye, Akçay Mehmet Emin, Geboloğlu Merve Dilek, Ergül Ali (2018). Bazı Elma (*Malus domestica* Borkh.) Genotiplerinin SSR'lara (Simple Sequence Repeats) Dayalı Genetik Karakterizasyonu. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 2018; 35:268-277.

3- Furan Mehmet Alp, Geboloğlu Merve Dilek, Arpalı Diğdem (2017). Dayanıklı R55 (6AL/6VS) Translokasyon Hattı ile Lokusa Özel SSR Markerleri Kullanılarak Tır Buğday (*Triticum aestivum* L. ssp. Vulgare Vill. V. *Leucospermum* Körn) Genotipinin Yr-26 Sarı Pas Hastalık Direncinin Değerlendirilmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi. 2017; 27(4):522-531.

4- Furan Mehmet Alp, Geboloğlu Merve Dilek (2017). Yetiştiriciliği Yapılan Bazı Türk Kışniş (*Coriandrum Sativum* L.) Çeşitlerinde Genetik Çeşitliliğin ISSR ve SRAP Markörleri Yardımıyla Değerlendirilmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi. 2017; 27(2): 248-254.

5- Geboloğlu Merve Dilek, Furan Mehmet Alp (2017). Bazı Türk Yazlık Ekmeklik Buğday Çeşitleri Arasındaki Genetik Farklılığın SSR Markörleriyle Belirlenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi. 2017; 27(1): 132-138.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler

1- Ateş Eren, Furan Mehmet Alp, Karataş Merve Dilek, Genli Gülistan (2022). Güneydoğu Anadolu Bölgesi Koşullarında Kavuzlu ve Kavuzsuz Arpa Çeşitlerinin Bazı Verim ve Kalite Karakterlerinin Karşılaştırılması (Oral-Abstract). IV-International Conference of

Food, Agriculture, and Veterinary Sciences. Van, Türkiye. 27-28 Mayıs 2022. Program and Abstract Book. P. 356-357.

2- Altunok Sümeyye, Altıntaş Serdar, Geboloğlu Merve Dilek, Özmen Canan Yüksel, Ergül Ali (2018). Some Dwarf Gene Expression Profiles in Different Almond Species (Poster-Abstract). 6th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey 2018 Dokuz Eylül Üniversitesi. İzmir, Türkiye. 5-8 Eylül 2018.

3- Oğuz Muhammed Çağrı, Geboloğlu Merve Dilek, Altıntaş Serdar, Altunok Sümeyye, Ergül Ali (2018). Regeneration from tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) hypocotyl explant (Poster-Abstract). International Agricultural Science Congress. Van, Türkiye. 9-12 Mayıs 2018.

4- Geboloğlu Merve Dilek, Furan Mehmet Alp (2018). Drought assesment in Turkish bread wheat varieties using a molecular approach (Oral-Abstract). International Agricultural Science Congress. Van, Türkiye. 9-12 Mayıs 2018.

5- Geboloğlu Merve Dilek, Oğuz Muhammed Çağrı, Altunok Sümeyye, Altıntaş Serdar, Ergül Ali (2018). Regeneration from eggplant (*Solanum melongena* L.) hypocotyl explant (Poster-Abstract). International Agricultural Science Congress. Van, Türkiye. 9-12 Mayıs 2018.

6- Özmen Canan Yüksel, Geboloğlu Merve Dilek, Altunok Sümeyye, Akçay Mehmet Emin, Ergül Ali (2017). Türkiye Armut Gen Kaynaklarının S-Allel Temelli Uyuşmazlık Durumlarının Tespiti. 2. Ulusal Yumuşak Çekirdekli Meyve Türleri Sempozyumu. Tokat, Türkiye. 26-28 Ekim 2017. Program and Abstract Book. p.28.

7- Furan Mehmet Alp, Geboloğlu Merve Dilek (2017). Assessment of Genetic Variation on Some Cultivated Turkish Coriander (*Coriandrum Sativum* L.) varieties based on ISSR and SRAP markers. The Third International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants. Girne, Kıbrıs. 13-1 Nisan 2017. Program and Abstract Book. p.359.

8- Koçak Metin, Yıldız Mehtap, Alp Şevket, Geboloğlu Merve Dilek, Turan Sibel (2016). Genetic Diversity in Wild *Fritillaria Imperialis* L. İN Van Lake (Turkey) Basin by iPBS Primers. VII international Scientific Agriculture Symposium. Jahorina, Bosna Hersek. 6-9 Ekim 2016. Program and Abstract Book. p.378.

9- Geboloğlu Merve Dilek (2015). Protoplast Kültürünün Bitki Islahında Kullanımı. Ulusal Tarım Kongresi. Afyon, Türkiye. 29-31 Ekim 2015. Program and Abstract Book. p.134-135.

10- Geboloğlu Merve Dilek (2015). Biyoteknolojinin Tarımda Kullanımı. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi. Afyon, Türkiye. 21-24 Ağustos 2015.

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

1- Muhammet Çağrı Oğuz, Merve Dilek Karataş, Ezgi Oğuz, Muhammad Mujtaba, Serdar Altıntaş, Ali Ergül (2021). The Comparison of Regeneration from Root Node Explants in Solanaceae. Pol. J. Environ. Stud. Vol. 30, No. 5 (2021), 1-10.

2- Karataş Merve Dilek, Hazratı Nahid, Yüksel Özmen Canan, Altıntaş Serdar, Akçay Mehmet Emin, Ergül Ali (2021). Identification of S-Allele Based Selfincompatibility of Turkish Pear Gene Resources. Tarım Bilimleri Dergisi, Doi: 10.15832/ankutbd.823872 (Yayın No: 7703698)

Original Research

The Comparison of Regeneration from Root Node Explants in *Solanaceae*

Muhammet Çağrı Oğuz¹, Merve Dilek Karataş², Ezgi Oğuz¹,
Muhammad Mujtaba¹, Serdar Altıntaş³, Ali Ergül^{1*}

¹Biotechnology Institute, Ankara University, Ankara 06110, Turkey

²Van Yüzüncü Yıl University, Department of Agricultural Biotechnology, Van, Turkey

³Siirt University Agricultural Biotechnology Department, Siirt, Turkey

Received: 8 September 2020

Accepted: 13 November 2020

Abstract

Tissue culture techniques in tomato, pepper and eggplant are important for the development of disease-resistant and high yielding varieties, which require a suitable regeneration protocol. Although shoot regeneration has been achieved by using different explants and cytokinin doses in *Solanaceae* species, very few studies have reported in vitro regeneration using root tissues. The current study is the first report to compare direct shoot regeneration capabilities using root node explants in three *Solanaceae* species (tomato, pepper, and eggplant) under three cytokinins (BAP, TDZ, and GA3) hormone. Plantlets were regenerated from the root node explants of tomato, pepper and eggplant in the media containing 0, 0.5, 1, 1.5 and 2mg/L of BAP, TDZ and GA3. Results revealed that the shoot regeneration of root node explants varied according to the species, cytokinins (BAP, TDZ and GA3) and doses of hormones. Among the species, the best shoot regeneration was observed in tomato followed by eggplant and pepper plants. While the shoot length was statistically significant in tomato, it was observed to be insignificant in pepper and eggplant. The highest number of root regeneration and root length was observed in tomatoes. The results obtained from the study will contribute to the development of successful/reproducible tissue culture protocols from roots node explants.

Keywords: *Solanaceae*, root node explants, regeneration, tomato, eggplant, pepper

Introduction

Successful/reproducible tissue culture protocols are required to determine the action mechanism of plant hormones on cellular differentiation, organ formation, somatic embryogenesis, direct regeneration, secondary metabolite/alkaloid production in plant

tissue during regeneration [1-3]. Besides, successful *in vitro* regeneration optimizations are an important step for studying somaclonal variations, *in vitro* mutations, herbicide tolerance, diploid induction; secondary metabolite production, economically important transgenic plant production and the development of somatic hybrids require an effective regeneration protocol [4-6]. Regeneration capability of different tissues depends on species, cultivar and genotype, cellular structure and cellular action mechanisms of

plant hormones [7]. Like other families, in *Solanaceae*, there is a huge potential in terms of protocol optimization for regeneration with maximum yield (shoots and roots).

Solanaceae contains about 4000 species of economically and ecologically important family presenting a large number of model plants, genetic resources, secondary metabolites, medically and chemically active substances [8]. In terms of environmental importance on agriculture, it has been reported that secondary metabolites and plant extracts obtained from plants belonging to the family *Solanaceae* can provide a protective effect against bacteria, fungi, harmful plant insects and abiotic damages [9, 10]. On the other hand; biotechnological studies in *Solanaceae* species were primarily focused on tomato and wild relatives (*Solanum* genus, former genus *Lycopersicon*) followed by eggplant (genus *Solanum*) and pepper species (genus *Capsicum*) [11, 12]. In pepper (*Capsicum annuum*) the regeneration experiments have been carried out following different tissue culture techniques such as direct organogenesis, axillary proliferation, axillary meristem, indirect somatic embryogenesis using zygotic embryo, cotyledon, hypocotyl, and leaf explants [13-18]. However, no study has been reported regarding the regeneration in pepper using root as explant.

As in other plants, in tomato (*Solanum lycopersicum*), abiotic stresses such as drought, salinity, and biotic environmental stresses like pathogens, insects and fungi are the main limiting factors in a plant's growth and productivity [19]. Tomato tissue culture studies which are important for biotechnological applications such as the determination of molecular mechanisms of these stresses and obtaining tolerant individuals have been performed largely by using cotyledon, hypocotyl, and leaf explants. However, few studies reported tomato regeneration using root explants [20-24]. Eggplant (*Solanum melongena*) belongs to *Solanaceae* and grown in tropical and semi-tropical climates. Issues like a genetic mismatch between species and infertility of varieties have prevented the development of tolerant varieties against biotic and abiotic damages. To overcome breeding problems in eggplant, advanced biotechnological methods such as tissue culture and plant genetic engineering instead of conventional methods increase the success rate [25]. Eggplant direct shoot regeneration studies were mainly carried out using cotyledon, hypocotyl, and leaf explants. Unlike other explants, stable optimization of direct shoot formation with root explants has not been reported [26-29].

The current study was designed to investigate and develop an optimized regeneration protocol using root node explants in pepper, tomato, and eggplants. Besides, comparative analysis of shoot growth and root elongation using root nodes was performed for the first time with a view to identify the regenerants with superior performance.

Material and Methods

Plant Material

In the current study, Ilca pepper (P-Ilca), H2274 tomato (T- H2274) and Aydın Black eggplant (EP-Aydın Black) cultivars were used as materials.

Seed Sterilization

Seeds were pretreated with water for 2 hr. to remove the protective chemical coating. Surface sterilization of seeds was carried out using 25% commercial bleach and a few drops of Tween 20 in the laminar cabin for 15 min. Afterward, the surface sterilization process was completed by washing the seeds 5 times (5 mins) with distilled water. Sterile seeds were sown on media after drying on blotter paper.

In vitro Regeneration

Sterilized seeds were germinated on MS media [30] containing 4.44 g/L MS salts (Caisson labs, Smithfield, USA), 30 g/L sucrose and 5 g/L agar (Duchefa Biochemie, Haarlem, The Netherlands) at 24°C in dark for 3 days. Germinated seedlings were incubated in a growth cabinet for 15 days at 25°C and under 16/8 h photoperiod. Root node explants isolated from *in vitro* grown seedlings were transferred to a liquid medium containing MS + Kinetin (Kin) (4 mg/L). After 24 hr explants were transferred to regeneration media containing different concentrations of cytokinins. Regeneration medium (MS: 4.43 g/L, sucrose: 30 g/L, plant agar: 7 g/L) containing different concentrations of BAP (MS-B) (Sigma, Missouri-USA) (0.00, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 mg/L), TDZ (MS-T) (Sigma, Missouri-USA) (0.00, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 mg/L) and GA₃ (MS-G) (Sigma, Missouri-USA) (0.00, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 mg/L). Five explants were cultivated in each magenta box and the experiment was performed in five replications. The Magentas were incubated in a growth chamber at 24°C under the 8/16 hr photoperiod. Regeneration efficiencies were evaluated after 3rd week.

Plant Acclimatization

Plants with root development observed were transferred to mixtures containing 2:1 sterilized peat: perlite. Young seedlings were transferred to flowerpots, covered with transparent bags and incubated at 50% humidity at 25±2°C until well-developed regenerates were obtained.

Statistical Analysis

All statistical analyzes were done using the IBM SPSS Statistics 22.0 program according to the randomized plot design. Mean values were compared

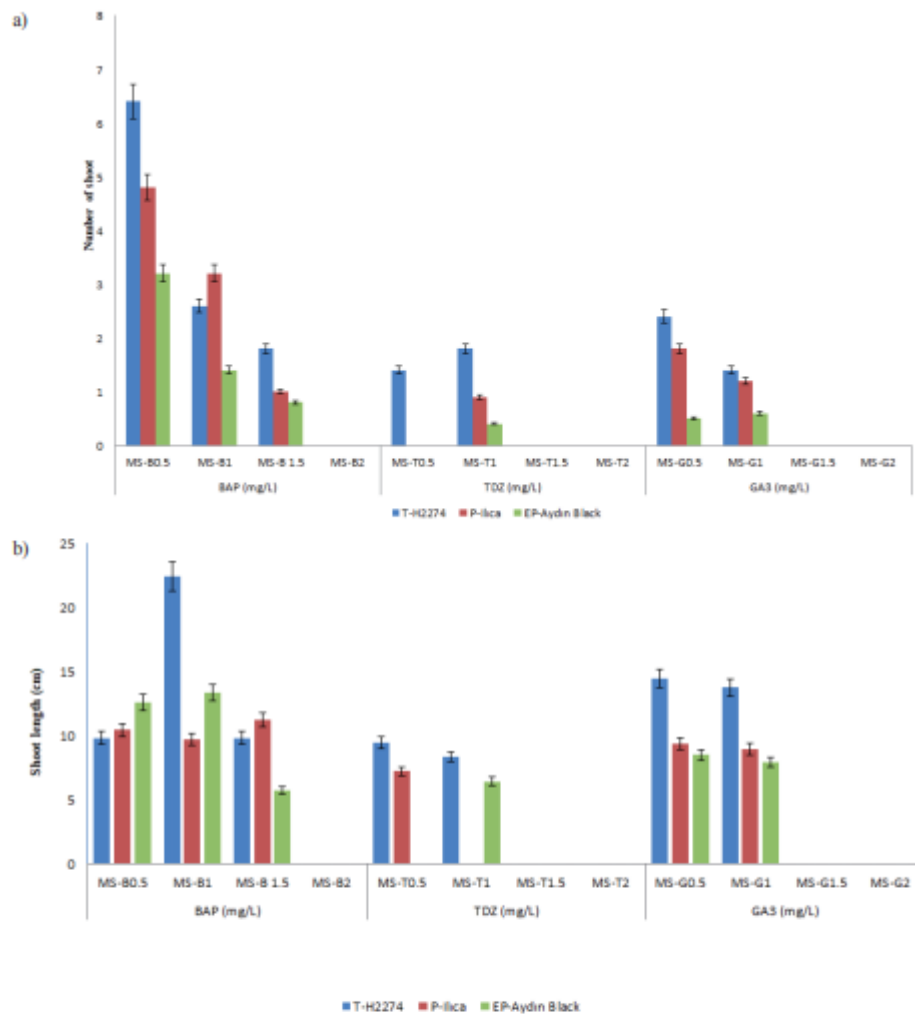


Fig. 1. a) number of shoot regeneration from root node explant; b) shoot lenght from root node explant.

by ANOVA followed by Tukey posthoc test at 0.05 level of significance.

Results

Shoot Regeneration

In the current study, three types of cytokinin hormones were applied (MS-B, MS-G and MS-T) to determine their effects on shoot formation in T- H2274, P-Ilica and EP- Aydın Black. Maximum shoots regeneration was observed from MS-B (Fig. 3b; Fig. 4c; Fig. 5d). Among the MS-B concentrations,

the best shoot formation was recorded for MS-B0.5 followed by MS-B1 and MS-B1.5. No shoot formation was observed in the medium containing MS-B2, while callus formation occurred in the same media (Fig. 1a). In media containing MS-B0.5, the highest shoot number was obtained from T- H2274 with 6.4 per explant followed by EP- Aydın Black with 3.2 and P-Ilica with 3.2. In media MS-B1, the highest numbers of shoots were obtained from EP-Aydın Black with 3.2 followed by T-H2274 with 2.6 and P-Ilica with 1.4 (shoot/per explant). In MS-B1.5, 1.8 shoots were obtained from T- H2274, 1 shoot from EP- Aydın Black and 0.8 shoot from P-Ilica (Fig. 1a).

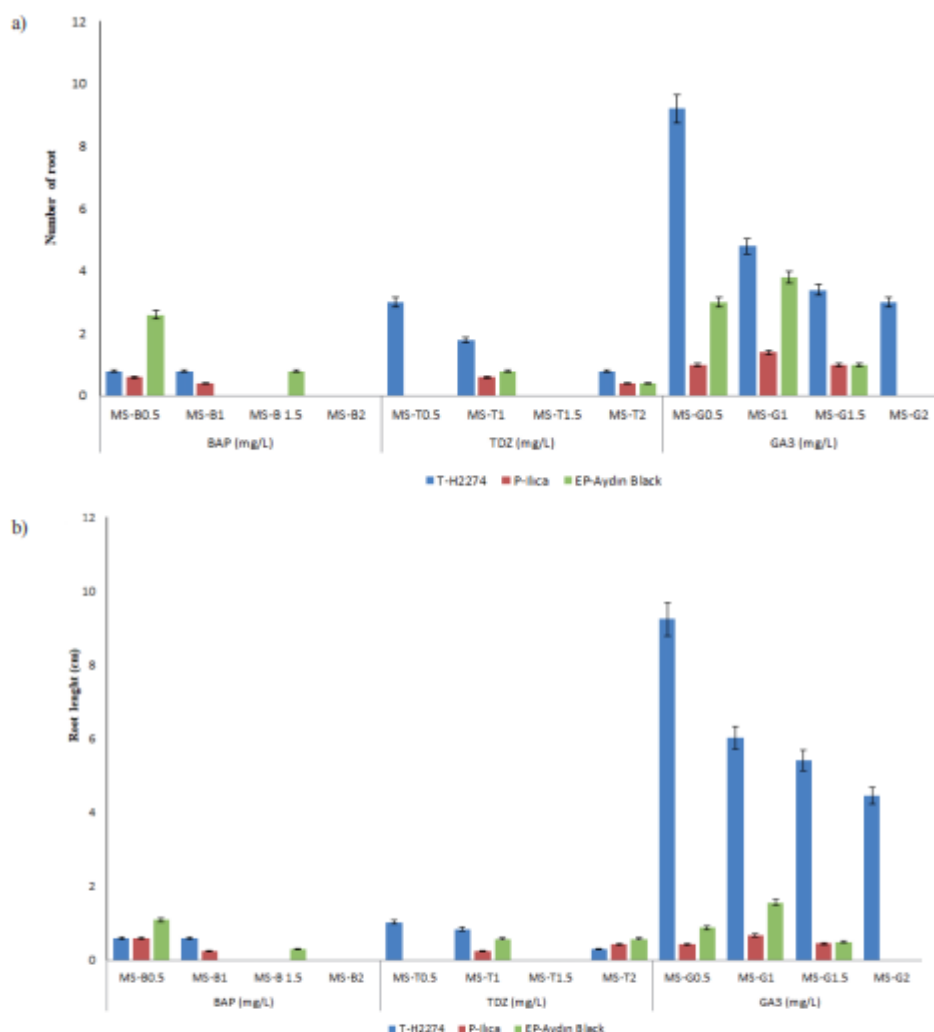


Fig. 2. a) number of root regeneration from root node explant; b) root length from root node explant.

In addition to BAP another plant hormone of cytokinin group i.e., GA₃ was applied and tested in terms of shoot formation ability in T- H2274, P-Ilica and EP- Aydın Black. According to the obtained results, for medium MS-G0.5, an average of 2.4 shoots was recorded in T- H2274, 1.8 in EP-Aydın Black and 0.5 in P-Ilica. In the medium MS-G1, the shoot regeneration rate was lower and an average of 1.4 shoot was observed in T- H2274 explant, 1.2 in EP-Aydın Black and 0.6 in P-Ilica.

The MS-T media resulted in the lowest shoot formation in all three vegetable species compared

to MS-B and MS-G. In media MS-T0.5 around 1.4 shoots were recorded in T-H2274. At MS-T1, the shoot regeneration was recorded as 1.8 in T-H2274, 0.9 in EP-Aydın Black and 0.4 in P-Ilica (Fig. 1a). In all of the media containing high levels of cytokinins, callus formations were observed in the root node explant, which was not be obtained from shoot.

At the end of 6th-week shoot lengths of fully-grown plantlets were recorded before they were transferred to soil for acclimatization (Fig. 1b). According to these results, the best shoot length from 3 different cytokinins was observed in T-H2274 i.e., 22.4 cm in the MS-B1

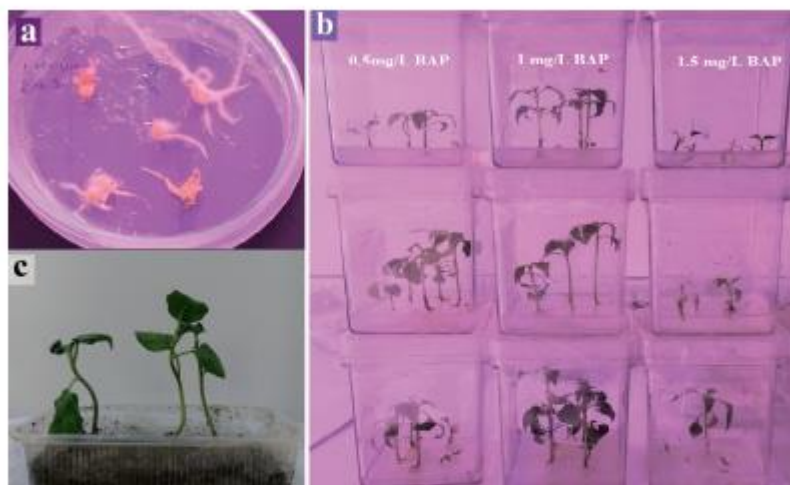


Fig. 3. *in vitro* plant regeneration from root node explant in pepper
a) pepper explants have root development in cytokinin media; b) shoot development was observed in media with different BAP;
c) development of regenerant plants in acclimatization environments

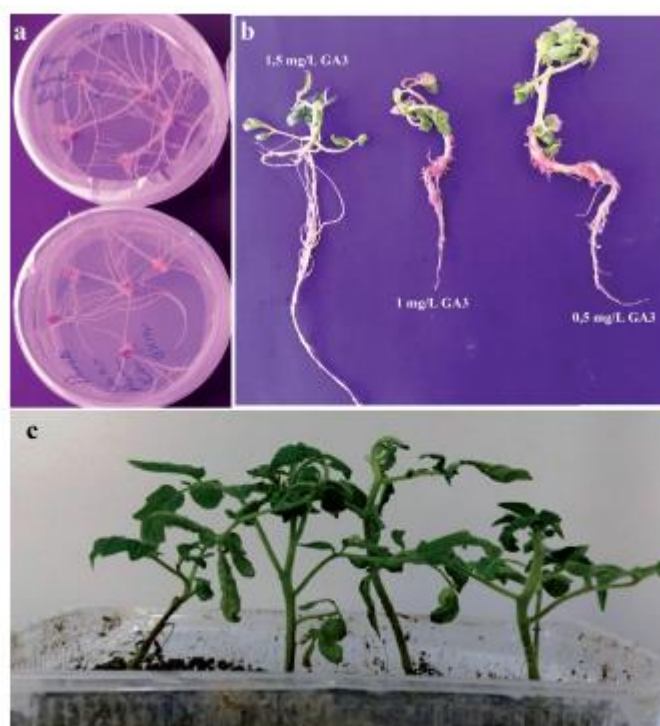


Fig. 4. *in vitro* plant regeneration from root node explant in tomato
a) root elongation of tomato root node explants in media containing GA3; b) tomato explants have completed the shoot and root regeneration. c) development of regenerant plants in acclimatization environments

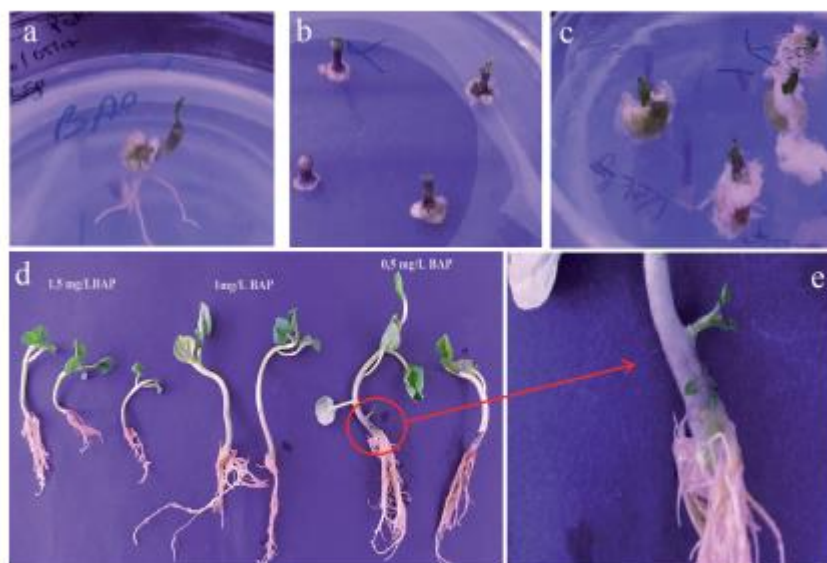


Fig. 5. *in vitro* plant regeneration from root node explant in eggplant
a) root and shoot regeneration of eggplant explants in BAP media; b,c) shoot regeneration from root node explants in media containing different concentrations of cytokinins; d) last state before acclimatization of plants whose shoot and root regeneration has been completed; e) continued shoot development from the root node explant

media followed by 14.4 cm (MS-G0.5) and 13.77 cm (MS-G1) ($p<0.05$) (Fig. 4c). The variation between MS-B and MS-T, application doses and species was found to be insignificant ($p>0.05$).

Root Regeneration

Adventitious root formations by root node explants at the end of the 3rd week in media containing cytokinins are given in Fig. 2a). Among the different cytokinins and application doses used, the most effective adventitious root formation was determined as 9.2 roots in MS-G0.5 in T-H2274 ($p<0.05$).

The best adventitious root regeneration in eggplant was determined as 3.8 in the MS-G1 medium. No statistically significant variation was found between the root regeneration of MS-G doses in EP-Aydın Black. The best adventitious root regeneration obtained in P-Ilica was recorded as 1.4 roots in MS-G1. Among the different doses of MS-T, root regeneration in 3 species occurred only at MS-T1, with significant variation ($p<0.05$). In media containing MS-T0.5, among all the plants, the adventitious root formation was observed only in tomato. There is no statistically significant difference in adventitious root formation at different doses of MS-B and among the three species ($p>0.05$). The lengths of adventitious roots from root node explants in the media containing cytokinin are given in Fig. 2b. Rather than the other two types of cytokinins, it

was MS-G that had the most effective influence on root elongation.

According to the other two *Solanaceae* species, It was determined that T- H2274 had the best root elongation capacity in the cytokinins environment (Fig. 4a-b). The best result was obtained from tomato root node explants (average 9.24 cm root elongation) in the MS-G0.5 medium. Among the three *Solanaceae* species, no statistical difference was observed in the effects of MS-G1, MS-G1.5 and MS-G2 on root elongation. Similarly, the effects of MS-T and MS-B concentrations on root elongation were insignificant. The difference between the root lengths of P-Ilica and EP-Aydın Black was also statistically insignificant ($p>0.05$) (Fig. 3a; Fig. 4a; Fig. 5a-e).

Discussion

Shoot Regeneration

As it is known, direct regeneration is essential to obtain plants with uniform genetic characteristics. It has been reported that direct regeneration from the explants, without going into the callus formation phase, can help prevent the callus related genetic variations. Therefore, direct regeneration is the most important for gene transformation [31, 32]. Considering this fact, in the current study we have obtained all the shoots from

root node explants with direct organogenesis without the formation of callus. Also, the root node explants isolated from young seedlings were kept in liquid MS media containing 4 mg / L Kin for 24 hr. in the dark and then planted in the media as per experimental design. An inducing factor is essential for the regeneration of tissue or cells isolated from the plant. Although the inducer required for organogenesis is later removed from the environment after a certain period, the growth and development that have started to continue [33].

In our study, we used a high dose of Kinetin for pre-treatment. This treatment was thought to have a positive effect on the formation of shoots from the root node explants. Although many biotechnological studies have been carried out in tomato using root explants, nodal explants and roots are rarely used for shoot regeneration. Besides, these studies did not proceed beyond the experimental dimension [34, 35]. Compared with eggplant and pepper, the tomato has been identified as the most responsive to shoot regeneration from root nodes. In this study, because of its high conversion potential, the root node explant was used for shoot formation in tomato, pepper and eggplants.

Pepper's success rate and speed in *in vitro* regeneration are closely related to genotypic features. Genotypically, regeneration is relatively slow and difficult compared to other members of *Solanaceae* [36]. Although pepper performs efficiently during organogenesis induction in the cytokinin-containing medium, the necessity of an auxin-containing medium for root formation has been reported [17]. In the regeneration study conducted, it was thought that the shoot and root emerging from the existing root explant will provide a significant advantage in the regeneration rate.

A high degree of self-pollination and lack of proper genetic resources in tomatoes is a major problem for breeding. Therefore, genetic diversity is gradually decreasing [37]. It is of great importance to obtain new varieties that help eliminate incompatibility problems between regeneration protocols and *Solanaceae* species introduced in the current study.

Considering these results, it has been revealed that different plant species have a different rate of regeneration even from a similar explant. Several species of *Solanaceae* family are the target model species for studying the mechanisms and hormonal interactions that become active in regeneration. Rashid and Bal [23] reported the use of a hypocotyl explant in tomato, and according to their results, the formation of shoot per explant lasted approximately 8 weeks. The highest shoot was obtained from the medium containing 0.5 mg/L BAP + KIN with an average of 3.87. On the other hand, in the current study, a higher regeneration rate was achieved by using root node explants than the hypocotyl. Besides, the lack of an additional rooting step kept the success rate of the procedure even higher and consequently making it a suitable protocol for the tested plants. Jehan and Hassanein [35], reported the

somatic embryogenesis from tomato nodal explant and achieved successful results in BAP containing media (2 mg/L BAP - 8.00 number of shoot/explant). Also, it has been reported that the media containing 1 mg/L IAA for rooting gave the best results and rooting occurred without auxin supplementation. In our study, in addition to obtaining similar values (0.5 mg/L BAP - 6.4 of shoot/explant) from root node explants at low BAP levels, root organogenesis occurred in auxin-free media. According to the reported shoot regeneration in eggplant using root explant [26], obtained shoot regeneration from the calluses using MS media with high BAP content. An additional intervention was needed for rooting from the shoots they obtain in the study. In our study, shoot regeneration was carried out as a result of direct organogenesis. Besides, an additional rooting phase was not needed as the shoots performed well during root formation. Similarly, a few researchers had reported obtaining rooting from different eggplant explants in an IBA containing media [38]. According to the report in eggplant regeneration from callus, obtained shoot (average 0.2) in containing a high amount of cytokinin medium [29]. However, in the current study, averages of 4.8 shoots were regenerated in the MS-B0.5 medium with direct organogenesis (without callus). The high regeneration rate in our case can be ascribed to the pre-treatment of explants with high concentrations of KIN for 1 day, which activated the cytokinin response in the tissues.

The current study can be considered the first report for successful direct organogenesis using a root node explant in pepper. In this way, a plant with stable genetic features was obtained for use in biotechnological studies. The number of shoots regeneration from root node explants, in pepper, was observed to be lower than tomato and eggplant. This can be due to the difference in the reaction mechanism of the species. It is thought that this study will contribute in terms of hormone-cell interactions in tissue culture studies, regeneration ability of different tissues and development of successful transgenic plant protocols. In the current study, callus formation was observed after the pre-treatment of the explants with Kin before transferring to high cytokinin containing media. However, no shoot formation was recorded from these explants. Callus formation can occur in the presence of pathogen infection, tissue injury, high auxin, or equal auxin-cytokinin hormones in the environment [39]. The callus formation in the root node explant (grown in high cytokinin media) is due to the endogenous auxin in the plant. It has been reported that calluses obtained from the root and hypocotyl explants have many of the structural features of the lateral root meristem [40]. It is predicted that new plants to be produced by using callus-derived callus obtained in our study will cause an increase in its development due to the strong plant nutrient absorption feature of the side root meristem.

Root Development

In the study carried out to analyze the endogenous hormones in the plant, the amount of total endogenous cytokinin on the shoots was determined 1.4 times more than the roots. Roots were reported to have higher IAA content than shoots [41]. Free cytokinins in the plant are carried from root to shoots [42]. On the other hand, auxin in the plant is produced in leaf tips [43] and stored in tissues close to the root [44]. In the absence of auxin, regardless of the number of cytokinins in the medium, it has been reported that tomato explants form adventitious roots, due to the accumulation of high independent endogenous auxin in hypocotyl and root cut regions [45, 46]. In our study, high *de novo* root regeneration was observed especially in tomato which can be linked to the endogenous auxin level. Similarly, Blakesley [42], reported that the ratio of free IAA to total IAA in the root region of young shoots was higher than the elder shoots where rooting has failed. In the current result, it is thought that root regeneration is stimulated by changing the cytokinin balance in young explants. With this viewpoint, this change in cytokinin level resulted in the activation of bound endogenous IAA in tissues and consequently stimulation of root regeneration in eggplant and tomato. It was further reported that the continuous application of an inducer is not required for the continuation of organogenesis and root elongation [33]. Besides, it has been reported that organogenesis and root elongation may be caused regardless of the ambient oxide in the medium, by the activation of genetic indicators due to cutting off the explant [47]. The low root regeneration of the pepper explant may be due to the lack of total IAA and free IAA. Also, activation of the genes responsible for auxin transport may cause this condition [48]. Orlńska and Nowaczyk; in their regeneration study conducted in pepper, they reported that rhizogenesis formation was observed in the auxin-containing media despite the absence of leafy shoots [17]. Bhutia et al; in an *in vitro* regeneration study conducted with cotyledon using hypocotyl explants, it was reported that root formation was observed 7-8 weeks after transfer of the obtained shoots to the auxin-containing/non-auxin media [49]. In our study, it is clear that there is an increase in the rate of root regeneration with the occurrence of root development in the early stages of regeneration with the root node explant selected.

The roots obtained from the root node explant in tomato and eggplants were formed as a result of *de novo* organogenesis. Reported that a similar study [50], *de novo* organogenesis occurred by re-activating the root tissue obtained from the root explant of the already existing meristematic tissue without the formation of callus. Jehan and Hassanein [35] investigated the effect of tomatoes explant position (horizontal or vertical) in the media. Results revealed that root organogenesis occurred in the explant placed vertically in auxin-free media while no organogenesis reported in horizontally placed explants. In addition to the other issues discussed in our study, the fact that the root node explants are

placed vertically in the media is thought to cause *de novo* root formation by allowing the endogenous auxin hormone in the tissue to move to the lower part of the explant.

From a different perspective. It has been reported that the transport of auxin and cytokinin stopped in this region after the root tissue has been cut and the healing path has been activated [51]. It has also been noted that after the root explant is isolated from the plant, there are genetically significant similarities between leaf and root vein development on this tissue [51]. When considered from this perspective, it is thought that, together with all other possibilities, genetic induction may also be involved in *in vitro* regeneration obtained from root tissue.

Conclusion

The current study was conducted to investigate the regenerative capabilities from root node explants of three different *Solanaceae*. Shoot regeneration was successfully performed using the root explant. Among the species, the best shoot regeneration rate was recorded for tomato, pepper, and eggplant respectively. Among the cytokinin hormones, the most effective hormone in shoot regeneration was determined as 0.5 mg/L BAP. The shoot length of the newly regenerated plants varied according to the plant species and cytokinin content. For the *Solanaceae* species, the best hormone in terms of root development and length was determined as GA3. The best root development and elongation ability were observed in tomato, eggplant, and pepper respectively. This study reveals important results that can be targeted in determining hormonal changes in root and shoot regeneration. For these reasons, the current successful and effective regeneration method; will serve important issues such as determining physiological, morphological, and molecular changes in root and shoot regeneration.

Author Contribution Statement

AE and MÇO designed and outlined the research. MÇO and MDK conducted the experiments. EO, MM, SA and MÇO analyzed the data, drafted and edited the manuscript and analyzed the data.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Canan Yüksel Özmen for her technical support in tissue culture studies.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Data Availability

The data from the study were presented in the text and tables and figures.

References

- GUBIS J., LAJCHOVÁ Z., FARAGÓ J., JUREKOVÁ Z. Effect of growth regulators on shoot induction and plant regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Biologia-Bratislava*, **59** (3), 405, **2004**.
- SHARMA P., SRIVASTAVA D. In vitro plant regeneration from cotyledon and hypocotyls tissues of tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. Solan Vajr). *Vegetos*, **27** (3), 151, **2014**.
- DEB G., SULTANA S., BHUIYAN M.S.U., SARKER K.K., PAPRY A.S. In vitro plant regeneration of wild eggplant (*Solanum sisymbriifolium*) to produce large number of rootstocks for tomato grafting. *Journal of Advanced Biotechnology and Experimental Therapeutics*, **2**, 65, **2019**.
- CHAUDHURI K., GHOSH B., JHA S. The root: a potential new source of competent cells for high-frequency regeneration in *Tylophora indica*. **22** (10), 731, **2004**.
- HEGDE V., PARTAP P.S., YADAV R.C. In vitro regeneration of *Capsicum* (*Capsicum annuum* L.) from cotyledon explants. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **6** (5), 225, **2017**.
- OO P.C., LEE Z.H., CHIN C.K., SUBRAMANIAM S., CHEW B.L. Shoot Induction in White Eggplant (*Solanum melongena* L. Cv. Bulat Putih) using 6-Benzylaminopurine and Kinetin. *Tropical life sciences research*, **29** (2), 119, **2018**.
- POCKOVSKA M., TRAJKOVA F., KOLEVA G. Evaluation of androgenic competence of different pepper, tomato and eggplant genotypes. in Book of Proceedings/X International Scientific Agriculture Symposium "Agrosym 2019". Faculty of Agriculture, East Sarajevo, Bosnia & Hercegovina. 525, **2019**.
- CHOWAŃSKI S., ADAMSKI Z., MARCINIAK P., ROSIŃSKI G., BÜYÜKGÜZEL E., BÜYÜKGÜZEL K., BUFO S.A. A review of bioinsecticidal activity of Solanaceae alkaloids. *Toxins*, **8** (3), 60, **2016**.
- SERNA F.J., CORREA J.A. Extractos de hojas de tomate *Lycopersicon esculentum* como fagoinhibidores de *Atta cephalotes*. **21** (3), 142, **2003**.
- SAMUELS J. Biodiversity of food species of the Solanaceae family: a preliminary taxonomic inventory of subfamily Solanoideae. *Resources*, **4** (2), 277, **2015**.
- GEBHARDT C. The historical role of species from the Solanaceae plant family in genetic research. *Theoretical and Applied Genetics*, **129** (12), 2281, **2016**.
- BUI H.H., SERRA V., PAGÈS L. Root system development and architecture in various genotypes of the Solanaceae family. *Botany*, **93** (8), 465, **2015**.
- KHAN H., SIDDIQUE I., ANIS M. Thidiazuron induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Capsicum annuum*. **50** (4), 789, **2006**.
- DO REGO E.R., DO RÊGO M.M., FINGER F.L. Production and breeding of chilli peppers (*Capsicum* spp.). Springer. **2016**.
- GROZEVA S., TODOROVA V. In vitro regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.) and characterization of plant-regenerants. *Electronic Journal of Biology*, **11** (1), 17, **2015**.
- HEIDARI-ZEFREH A.A., SHARIATPANAH M.E., MOUSAVI A., KALATEJARI S. Enhancement of microspore embryogenesis induction and plantlet regeneration of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) using putrescine and ascorbic acid. *Protoplasma*, **256** (1), 13, **2019**.
- ORLINSKA M., NOWACZYK P. In vitro plant regeneration of 4 *Capsicum* spp. genotypes using different explant types. *Turkish Journal of Biology*, **39** (1), 60, **2015**.
- KIM H., LIM J. Leaf-induced callus formation in two cultivars: hot pepper 'CM334' and bell pepper 'Dempsey'. *Plant signaling & behavior*, **14** (7), 1604016, **2019**.
- DU Y.D., CAO H.X., LIU S.Q., GU X.B., CAO Y.X. Response of yield, quality, water and nitrogen use efficiency of tomato to different levels of water and nitrogen under drip irrigation in Northwestern China. *Journal of integrative agriculture*, **16** (5), 1153, **2017**.
- MOGHAIEB R.E., SANEOKA H., FUJITA K. Plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **45** (3), 639, **1999**.
- VIKRAM, G., SRIKANTH, K., SWAMY, B. Effect of plant growth regulators on in vitro organogenesis in cultivated tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **1** (4), 263, **2011**.
- MAMIDALA P., NANNA M.B. Effect of genotype, explant source and medium on in vitro regeneration of tomato. **3**, 45, **2011**.
- RASHID R., BAL S.S. Effect of hormones on direct shoot regeneration in hypocotyl explants of tomato. **2** (1), 70, **2010**.
- PERES L.E., MORGANTE P.G., VECCHI C., KRAUS J.E., VAN SLUYS M.A. Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of tomato cultivars and wild related species. **65** (1), 37, **2001**.
- SHIVARAJ G., RAO S. Rapid and efficient plant regeneration of eggplant (*Solanum melongena* L.) from cotyledonary leaf explants. **2011**.
- FRANKLIN G., SHEEBA C., LAKSHMI SITA G. Regeneration of eggplant (*Solanum melongena* L.) from root explants. *Plant*, **2004**.
- SARKER R.H., YESMIN S., HOQUE M.I. Multiple shoot formation in eggplant (*Solanum melongena* L.). **16** (1), 53, **2006**.
- MIR K.A., DHATT A.S., SANDHU J.S., GOSAL S.S. Genotype, explant and culture medium effects on somatic embryogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). **49** (3), 182, **2008**.
- RAY B.P., HASSAN L., SARKER K. In vitro cultivation and regeneration of *Solanum Melongena* (L.) using stem, root and leaf explants. **1** (1), 49, **2011**.
- MURASHIGE T., SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, **15** (3), 473, **1962**.
- EVANS D., BRAVO J. Phenotypic and genotypic stability of tissue cultured plants, in Tissue culture as a plant production system for horticultural crops. Springer. **73**, **1986**.
- SRIVATANAKUL M., PARK S.H., SANDERS J.R., SALAS M.G., SMITH R.H. Multiple shoot regeneration of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) from a shoot apex culture system. **19** (12), 1165, **2000**.
- MOHNEN D. Novel experimental systems for determining cellular competence and determination, in Biology of adventitious root formation. Springer. **87**, **1994**.

34. BHATIA P., ASHWATH N., SENARATNA T., MIDMORE D. Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **78** (1), 1, **2004**.
35. JEHAN S., HASSANEIN A., Hormonal requirements trigger different organogenic pathways on tomato nodal explants. **4** (11), 2118, **2013**.
36. KUMAR S. A review on ethno-medicinal properties and plant tissue culture of high value solanaceous plants. *J. Phytol. Res* **30** (2), 63, **2017**.
37. SHARMA U., SINGH P., RAI N.P. Regeneration study in *Solanum lycopersicum*.
38. SIDHU M., DHATT A., SIDHU G. Plant regeneration in eggplant (*Solanum melongena* L.): A review. **13** (6), 714, **2014**.
39. IKEUCHI M., SUGIMOTO K., IWASE A. Plant callus: mechanisms of induction and repression. **25** (9), 3159, **2013**.
40. ATTA R., LAURENS L., BOUCHERON-DUBUISSON E., GUIVARCH A., CARNERO E., GIRAUDAT-PAUTOT V., CHRIQUI D. Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown in vitro. **57** (4), 626, **2009**.
41. TRIFUNOVIĆ-MOMČILOV M., MOTYKA V., DRAGIČEVIĆ IČ., PETRIĆ M., JEVREMOVIĆ S., MALBECK J., SUBOTIĆ A. Endogenous phytohormones in spontaneously regenerated *Centaurium erythraea* Rafn. plants grown in vitro. *Journal of Plant Growth Regulation* **35** (2), 543, **2016**.
42. BLAKESLEY D. Auxin metabolism and adventitious root initiation, in *Biology of adventitious root formation*. Springer. 143, **1994**.
43. ALONI R., SCHWALM K., LANGHANS M., ULLRICH C.I. Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Planta*. **216** (5), 841, **2003**.
44. SCARPELLA E., MARCOS D., FRIML J., BERLETH T. Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport. *Genes & development* **20** (8), 1015, **2006**.
45. ASHAKIRAN K., SIVANKALYANI V., JAYANTHI M., GOVINDASAMY V., GIRIJA S. Genotype specific shoots regeneration from different explants of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) using TDZ. **1** (2), 107, **2011**.
46. KUROHA T., KATO H., ASAMI T., YOSHIDA S., KAMADA H., SATOH S. A trans-zeatin riboside in root xylem sap negatively regulates adventitious root formation on cucumber hypocotyls. **53** (378), 2193, **2002**.
47. MARHAVÝ P., MONTESINOS J.C., ABUZEINEH A., VAN DAMME D., VERMEER J.E., DUCLERCQ J., BENKOVÁ, E. Targeted cell elimination reveals an auxin-guided biphasic mode of lateral root initiation. **30** (4), 471, **2016**.
48. HEISLER M.G., HAMANT O., KRUPINSKI P., UYTTEWAAL M., OHNO C., JONSSON H., MEYEROWITZ E.M. Alignment between PIN1 polarity and microtubule orientation in the shoot apical meristem reveals a tight coupling between morphogenesis and auxin transport. *PLoS biology*. **8** (10), **2010**.
49. BHUTIA K.L., MEETEI N., KHANNA V. In vitro direct regeneration of Dalle Khursani (*Capsicum annum*) from salicylic acid treated explants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. **7** (2), 1008, **2018**.
50. ZELCER A., SOFERMAN O., IZHAR S. Shoot regeneration in root cultures of Solanaceae. **2** (5), 252, **1983**.
51. MELNYK C.W., Plant grafting: insights into tissue regeneration. *Regeneration*. **4** (1), 3, **2017**.



Identification of S-Allele Based Self-incompatibility of Turkish Pear Gene Resources

Merve Dilek KARATAŞ^a, Nahid HAZRATI^b, Ezgi OĞUZ^b, Canan YÜKSEL ÖZMEN^b,
Serdar ALTINTAŞ^c, M. Emin AKÇAY^d, Ali ERGÜL^{b*}

^aVan Yüzüncü Yıl University, Faculty of Agriculture, Department of Agricultural Biotechnology, 65090 Tuşba, Van TURKEY

^bAnkara University, Biotechnology Institute, 06135 Keçiören, Ankara-TURKEY

^cSüriye University, Faculty of Agriculture, Department of Agricultural Biotechnology, 56100 Süriye, TURKEY

^dRepublic of Turkey Ministry of Agriculture and Forestry, Atatürk Horticultural Central Research Institute, Yalova, TURKEY

ARTICLE INFO

Research Article

Corresponding Author: Ali ERGÜL,

Received: 10 November 2020 / Revised: 09 April 2021 / Accepted: 11 April 2021 / Online: 25 March 2022

ABSTRACT

Self-incompatibility is considered to be a growth-limiting factor in fruit plants. In species with hermaphrodite flowers, S-locus (S-allele) has been accepted to control self-incompatibility, and the genetic control of this locus is provided by multiple genes (alleles). Pear (*Pyrus communis* L.) belongs to the *Pomoideae* from the *Rosaceae* family and is found to have great genetic potential in terms of ecological features in Turkey. To protect these cultivation features, national garden collections have been established across the country and Atatürk Horticultural Central Research Institute-Yalova collection is considered as genes bank. Identification of the different features of this collection (fruit quality, stress tolerance, self-incompatibility, grafting incompatibility, etc.) is of great importance for its utilization in pear breeding and cultivation. However, to our knowledge, this collection has not been characterized

for self-incompatibility trait. In the current study, PCR (Polymerase Chain Reaction)-based amplification of the S-allele regions (*S₁*, *S₂*, *S₃*, *S₄*) causing the self-incompatibility in 180 pear genotypes obtained from the national pear germplasm was investigated by molecular biological methods based on the comparison of amplified products. In 180 pear genotypes, the *S₂* allele was the most prevalent one with 63% frequency, while the *S₃* allele was the least common allele with a rate of 4%. In allele combinations, the *S₁-S₂* allele combination was the most common allele combination with a rate of 18%, and trilateral allele combinations (*S₁-S₂-S₃* and *S₁-S₂-S₄*) were observed at a rate of 1%. Findings of the current research will enable the classification of the materials and the analysed material is likely to be used in breeding studies as well as pear cultivation.

Keywords: Pear genotypes, self-incompatibility, S-allele, PCR amplification

© Ankara University, Faculty of Agriculture

1. Introduction

Pear (*Pyrus communis* L.), is common fruit grown in almost all moderate climates especially in Europe and Asia. In Turkey, Anatolia area is considered as the homeland and/or diversity centre for many fruit trees. About 640 different pear genotypes have been found in the country. To protect these gene sources, local nominated genotypes in different eco-geographical regions have been collected and protected within this area (Akçay et al. 2014).

Self-incompatibility (SI) in flower-bearing plants is known as a failure in self-fertilization, which may be controlled genetically. Self-incompatibility is known as an unfavourable feature in successful fertilization and fruit set. This phenomenon has been found in more than 100 plant families and has been reported in nearly 40% of plant species (Igic et al. 2008) involving some major crop plants like pome, potato, canola, cocoa, olive, stone fruits, coffee, etc. and/or wild relatives of the mentioned crops. In the majority of plants, genetic control of self-incompatibility is done by a single multiallelic locus named S-locus however, control of the systems by two or more loci in some crops like grasses has also been identified (De Nettancourt 2001). Determinants of both female and male specificity which their products are expected to interact and operate the function of self or non-self-distinction are encoded by the S-locus (Iwano & Takayama 2012; Muñoz-Sanz et al. 2020).

Depending on the function time of the gene in the stamen, most SI types can be categorized as gametophytic or sporophytic. In sporophytic self-incompatibility (SSI), determination of the SI phenotype is defined by the diploid genotype of parental or pollen-donor plant (sporophyte) and in gametophytic SI (GSI), the SI phenotype is determined by the pollen gametophytic haploid genotype (gametophyte) (Hiscock & Tabah 2003). At the molecular level, three mechanisms of the SI have been identified. In *Brassicaceae*, sporophytic self-incompatibility (SSI) has been identified while two separate types of gametophytic self-incompatibility (GSI) including S-RNase-based SI widely elucidated in *Solanaceae* and *Rosaceae*, and the Papaver based system relating to the programmed cell death (PCD) (Muñoz-Sanz et al. 2020).

In GSI which is considered to be the most prevalent type of SI, the cross becomes completely compatible when the male parent (haploid pollen genome) and female parent (diploid pistil genome) contain entirely disparate *S*-genotypes without any common *S*-allele (for instance $S_1S_2 \times S_3S_4$). In case one *S*-allele is shared by the parents (for instance $S_1S_2 \times S_1S_3$), proceeding of the pollen tube containing the similar allele is inhibited by pistil and consequently, the cross is considered to be semi-compatible. Accordingly, in case the same *S*-alleles are carried by the parents at the self-incompatibility locus (for instance $S_1S_2 \times S_1S_2$), growth of the pollen cannot be happened on stigma. In other words, in case pistil-pollen couples do not include the same alleles, include at least one similar allele, or include several alleles, full compatibility, semi-compatibility or incompatibility is encountered, respectively. In crosses with the semi-compatible behaviour, half of the existing pollens are inhibited and could affect the yield and fruit set significantly, for example in Japanese plums, European pears and apple (Schneider et al. 2005; Zisovich et al. 2005; Goldway et al. 2008; Sapir et al. 2008). Results of the incompatibility are observed in minimum seed set and consequently, higher rates of small fruit formation, and yield loss.

Though GSI system applies similar genes in different taxa to specify the pollen rejection system, the mechanism elaboration differs significantly. Moreover, in all families, at least two linked genes or often more, are involved in *S*-locus consisting of a set of pollen-expressing *SFBB* genes (*S*-locus *F*-Box Brothers) and a pistil-expressed *S-RNase* gene. Pistil-expressed glycoproteins which show ribonuclease activity are encoded by *S-RNase* and they function as extremely selective cytotoxins which result in inhibition of pollens germination and growth when pollen single *S*-haplotype corresponds to one of the diploid pistil *S*-haplotypes (Sanzol & Robbins 2008; Gao et al. 2015; Claessen et al. 2019; Muñoz-Sanz et al. 2020). Another is an *F*-box protein gene which is distinctly expressed in pollen, is named *SFB* or *SLF* according to the family (De Franceschi et al. 2012; Bagheri & Ershadi 2019; Muñoz-Sanz et al. 2020).

Ability to predict the genomic structure of the pear *S*-locus has been performed using BAC cloning and sequencing in the Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) (Sassa et al. 2007). This was the first study to reveal the existence of several *SFBB* genes surrounding the *S-RNase*. Comparing the genomic sequence surrounding the *S2*- and *S4-RNases*, elucidated meaningful changes in the orientation and position of the *SFBB* genes in pear *S*-haplotypes compared to the *S-RNase* gene (Okada et al. 2011; Claessen et al. 2019).

In *Rosaceae* and *Solanaceae*, *S*-haplotypes have 16 to 20 *SLF* gene sequences which collectively contribute to SI function of the pollen (Kubo et al. 2010; Kakui et al. 2011; Williams et al. 2014; Muñoz-Sanz et al. 2020). Sequence alignment of the *S-RNase* amino acid revealed five regions with the conserved characteristics (i.e. C1, C2, C3, C4, and C5) along with a highly variable region. In addition, a highly polymorphic intron located between the C2 and C3, is found in the hyper variable region (De Franceschi et al. 2012; Bagheri & Ershadi 2019).

2D-PAGE (Two-dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis) technique has been used to determine mentioned *S*-genotypes earlier. Despite being a fast technique, it is not preferred by plant breeders because it is not a reliable and easy method (Ishimizu et al. 1996). In the following years, PCR technique was applied to identify protected nucleotide sequences of *S-RNase*. Zuccherelli et al. (2002) isolated 2 *S*-allele DNA fragments in Japanese pear and proved that their sequences are similar to that of databank sequences. Among them, 6 *S*-allele fragments (S_a , S_b , S_c , S_d , S_e and S_f) have been cloned and sequenced. Using these alleles, the *S*-allele genotyping was performed in 10 pear genotypes (Barlett, Cascade, Doyennedue Comice, Abbé Fétel, Beurré Hardy, Passe Crassane, Conference, Beurré Bosc, Max Red Bartlett, Eletta Morettini), and the molecular data obtained were confirmed by field crossing results. In the study, PCR based *S*-allele genotyping at molecular level has been shown to be more fast and valid method for European pears.

A similar result was reported by Sanzol & Robbins (2008), that partially *S*-genotyped European pear cultivars and semi-compatible test-crosses of these cultivars resulted in the identification of 14 *S*-alleles (S_1 to S_{14}) at the phenotypic level and allele-specific PCR led to the distinction across *S-RNases* that yielded amplification products with similar size using appropriate primers. The authors concluded that these two procedures presented a system for discrimination of all fourteen *S*-alleles in European pear at the molecular level.

Although self-pollination could have occurred in pear, the commercial-scale production depends on the existence of at least two simultaneously flowering compatible cultivars to enable appropriate and effective cross-fertilization so, exploiting of self and inter-compatible cultivars are important for economic fruit set (Zisovich et al. 2010; Goldway et al. 2012). In addition, in last decades, repeated use of scant numbers of cultivars in fruit breeding programs led to increase in cross-incompatibility property as well as a narrow genetic base in new pear varieties (Sanzol & Herrero 2002; Bagheri & Ershadi 2019). In this point of view, identification of the *S*-genotypes of the given species is important for revealing the species and inter-species fertilization biology to proper utilization in breeding programs (Quinet et al. 2014).

Although the incompatibility has been investigated in many pear germplasms, no findings relating to the self-compatibility/incompatibility have been encountered in genotypes of Turkey. In this paper, we evaluated the *S*-allele profiles of the pear genotypes of Turkey national collection in terms of fertilization biology.

2. Material and Methods

2.1 Plant material

180 pear (*Pyrus communis* L.) genotypes were obtained from the Atatürk Horticultural Central Research Institute, Yalova, Turkey, as plant material (Supplementary Table 1).

Table 1- Primer sequences for allele-specific PCR

Primer	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	PCR product size
<i>PyrusS1</i> **	aatgtaagactacagccctg	tcacacagtgccctgttg	367bp
<i>PyrusS6</i> *	gttgtggcctcaaacgacg	gtgacccctttaaagaactgc	347bp
<i>PyrusS7</i> **	tcaccagaaaattgcactaatgc	ccagtggccttgattcccaa	352bp
<i>PyrusS8</i> **	gtcattgacggggttgaaacc	ccaactggccttgagtgat	218bp

*: Ishimizu et al. (1999); **: Nashima et al. (2015)

2.2 Polymerase chain reactions (PCR)

Genomic DNA was isolated from the pear leaves according to Lefort et al. (1998). Determination of the DNA quantity was performed using Nanodrop ND-100 spectrophotometer and extracted DNA was checked on 1% agarose gel.

Allele-specific primers were applied for identifying the single alleles (*S1*, *S6*, *S7*, *S8*). Nucleotide sequences of *PyrusS1*, *PyrusS6*, *PyrusS7*, and *PyrusS8* primers were obtained according to Ishimizu et al. (1999) and Nashima et al. (2015), respectively (Table 1). Optimization of PCR (BioRad T100™) was conducted for used primers as follows: 5X PCR reaction buffer, 25 mM MgCl₂, 100 μM dNTP, 5 pmol primer, 5U Taq polymerase and 50-250 ng of genomic DNA was performed at a total volume of 15 μL. Negative control was conducted for controlling each PCR contamination. PCR program was performed as follows; 3 minutes pre-denaturation at 94 °C, 10 cycles (94 °C 1 min; 65 °C 1 min 45s; 72 °C 2 min; reducing the annealing temperature by 1 °C each cycle), 20 cycles (94 °C 1 min; 50 °C 1 min 45s; 72 °C 2 min) and final extension was performed at 72 °C for 10 minutes.

2.3. Evaluation of *S*-alleles according to band profiles

Amplified PCR products were separated by 2% agarose gel electrophoresis along with DNA marker (Solis Byodyne) in 100 V for 1 hour and thereafter, DNA bands were visualized using a visualization system (Gene Genius Bio Imaging System) (Figure 1).

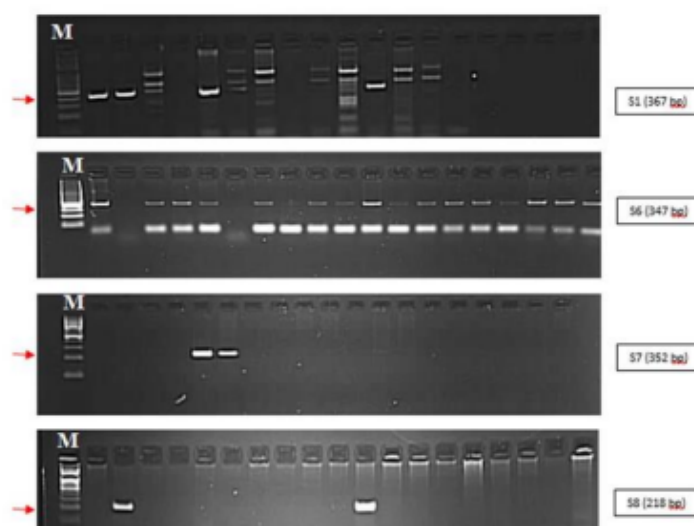


Figure 1- Examples of *S*-allele-specific PCR amplification images (*S1*, *S6*, *S7* and *S8* respectively). M: 100bp DNA ladder

After agarose gel visualization, genotypes with 367 bp (base pairs) in *PyrusS₁* primer, 347 bp in *PyrusS₆* primer, 352 bp in *PyrusS₇* primer, and 218 bp in *PyrusS₈* primer were considered self-incompatible for the relevant *S*-allele. Allele distribution features determined by Broothaerts et al. (1996) and Ishimizu et al. (1999) have been considered in evaluation of the results.

Among four *S*-alleles, genotypes with at least one-two of which were accepted as semi-compatible, genotypes without amplified fragments were introduced as compatible, and the genotypes with three *S*-alleles are considered to be incompatible.

3. Results and Discussion

By identifying self-incompatibility in genotypes at molecular levels using *S*-alleles, findings of the pear gene resources have been revealed in Turkey (Supplementary Table 1).

3.1. Relationship of compatibility and genetic similarity

Two homonyms of Yalova pear genotypes named “Göksulu (Malatya)” and “Göksulu” (Akçay et al. 2014), showed to possess no similar *S*-alleles and were determined to be semi-compatible.

According to Akçay et al. (2014), “150 887 (1-5)” and “240 887 (3-3)” genotypes with a similarity rate of 91.7% were observed to contain same *S* allele (*S₆*). Also, in “Bey Armudu” and “16” genotypes, with 91.7% similarity, the first genotype contained *S₆* allele while the other one was identified to be whole compatible (Supplementary Table 1).

3.2. Relationship of compatibility and triploidy

In a trial, genetic analyses using 18 SSR loci in 11 pear genotypes revealed presence of three alleles in 4-10 loci, and these genotypes have been identified as potential triploid genotypes (Akçay et al. 2014). In the current study, high variation of SSR alleles detected earlier, was not observed in incompatibility alleles and the *S₆* allele was the most observed allele in these triploid incompatible genotypes and while there was no incompatibility allele observed in other 5 genotypes (A 2411, E. Buzbağ, A 2407, 265 GFAE, 140 887 (2-2)) the rest showed at least one incompatible allele (Table 2).

Table 2- Self-incompatibility states of triploid genotypes in SSR analyses

<i>Triploids pear genotypes in SSR analysis</i>	<i>Incompatibility allele</i>	<i>PCR based- Incompatibility status</i>
190 887 (3-7)	<i>S₆S₆</i>	Semi-compatible
140 887 (2-1)	<i>S₆S₆</i>	Semi-compatible
A 2412	<i>S₁S₆</i>	Semi-compatible
A 2404	<i>S₆S₆</i>	Semi-compatible
A 2401	<i>S₆S₇</i>	Semi-compatible
A 2411	-	Compatible
E. Buzbağ	-	Compatible
A 2407	-	Compatible
265 GFAE	-	Compatible
140 887 (2-2)	-	Compatible

Table 3- *S*-Alleles, self-incompatibility cases and numbers

<i>S allele</i>	<i>Number of genotypes</i>	<i>PCR based-Incompatibility status</i>
<i>S₆S₆</i>	69	Semi-compatible
<i>S₆S₇</i>	4	Semi-compatible
<i>S₆S₈</i>	2	Semi-compatible
<i>S₇S₇</i>	5	Semi-compatible
<i>S₈S₈</i>	3	Semi-compatible
<i>S₁S₁</i>	14	Semi-compatible
<i>S₁S₆</i>	33	Semi-compatible
-	46	Compatible
<i>S₁S₆S₈</i>	2	Incompatible
<i>S₁S₆S₇</i>	2	Incompatible

3.3. Identification of alleles and compatibility

To improve the knowledge of self-incompatibility and its relations to many new pear genotypes, we elucidated *S*-genotype of 180 pear genotypes and arranged them based on their *S*-*RNase* alleles in 10 incompatibility groups (Table 3). Our results revealed incompatibility relations among a great number of pear genotypes in Turkey with unknown previous pollination requirements. These findings of given genotypes will be beneficial for indicating the potential of fertilization and fruit set, establishing the isolated gardens, and selecting as pollinizer.

In this research, four different *S*-alleles (*S*₁, *S*₆, *S*₇, *S*₈) whose primers have been identified in similar work (Kim et al. 2002; Nashima et al. 2015) were optimized and band size of 180 pear genotypes was determined. 130 out of 180 genotypes which contained at least one *S*-allele were identified as semi-compatible. From the rest, 4 of which containing three *S*-allele were determined as incompatible. In 46 genotypes, it was not observed any *S*-allele and being different from the others, they were identified as compatible genotypes (Table 3).

*S*₆ allele was observed with 63% rate followed by *S*₇ with 28% rate. *S*₈ was the less observed *S*-allele with 4% rate. The highest bilateral *S*-allele combination was observed in *S*₇-*S*₆ (18%), and the highest trilateral combinations were *S*₇-*S*₆-*S*₇ and *S*₇-*S*₆-*S*₈ (1%). Quadripartite combination was not observed in any genotype.

In terms of *S*₁, *S*₆, *S*₇, and *S*₈ alleles, 46 genotypes (25%) contained none of them, 91 genotypes (50%) contained one of them, 39 genotypes (21%) contained two of them, and 4 genotypes (2%) contained three of them. No genotype containing all of the mentioned alleles was observed (Table 3).

Similar to our work, 14 Japanese pear genotypes were investigated using 11 *S*-alleles including *S*₁, *S*₆, *S*₇, and *S*₉ alleles, and these alleles are applicable effectively for rapid identification of *S*-genotypes in similar pear breeding studies, and marker-assisted selection (MAS) performing (Nashima et al. 2015). Low sequence similarity of allele introns (average 43%) and high polymorphism in exon regions have been shown as the causes of high performance features of these *S*-alleles (Nashima et al. 2015). Nashima et al. (2015) identified existence of peculiar amplification (especially between 55-61 °C) through various PCR optimization trials of the *S*₁, *S*₆, *S*₇, and *S*₉ primers, and observed undesirable fragments on agarose gel in all primer pairs under 100 bp. In our research, these primers were similarly optimized using Touch Down PCR (*T*_m between 55-65 °C) program and some non-specific band was observed among PCR products.

Nowadays, *S*-allele genotyping trials at molecular level have been accelerated. Up until now, *S*-allele cloning and sequencing has been performed in about 26 European pear genotypes. In addition, genotyping of *S*-*RNase* genes in more than 150 pear genotypes has been carried out (Sanzol & Herrero 2002; Zuccherelli et al. 2002; Zisovich et al. 2004; Sanzol et al. 2006; Takasaki et al. 2006; Sanzol & Robbins 2008; Goldway et al. 2009; Sanzol 2009 a, b; Nashima et al. 2015).

In our study, since the high numbers of genotypes possess *S*₆ allele, so this allele was chosen as the prevalent one. The high ratio of genotypes bearing the *S*₆ allele (112 out of 180 genotypes) in comparison to genotypes bearing *S*₇ and other two alleles, could be explained by a plausible hypothesis that the *S*₆-locus is linked to another gene or genes encoding an important trait for pear cultivation or quality so, it could be mentioned that the *S*₆ allele involved a selective preference during breeding. A previous study on European pears revealed that certain *S*-alleles have considerably more frequency, and selection for commercial traits was proposed to describe this result. In this regard, Sanzol & Robbins (2008) noted that the majority of selected offspring of "Williams Bon Chrétien" cultivar with *PcS101* and *PcS102* *S*-alleles comprised the *PcS101* allele rather than the *PcS102* allele. The authors suggested that the *PcS101* allele is of interest throughout selection. In addition, genetic analyses of species belonging to distant taxa are quite consistent with this feasibility (Burke et al. 2002; Gandhi et al. 2005). Nevertheless, it could be mentioned that the high use of certain genotypes as parent in breeding programs could also be one of the reasons for the abundance of certain alleles.

In our study, Williams cultivar was employed as a reference genotype and displayed an incompatible feature similar to previous studies (Sanzol & Herrero 2002). *S*-allele-specific PCR analysis (*S*₁, *S*₆, *S*₇ and *S*₈, respectively) are given in Figure 1 and the Williams cultivar representing reference genotype with known *S*-*RNases* (*S*₁*S*₆), gave the expected PCR products corresponding to each allele and after electrophoresis, the higher frequency of *S*₆ allele was sensibly distinct among studied genotypes (Figure 1). Orcheski & Brown (2012) noted that, since specific reference cultivars are often used as parent in breeding programs of new cultivars so, their related *S*-alleles are found frequently in new developed commercial cultivars.

In the current study, three alleles were found in the four genotypes, namely 'E2480 Kızıl Yıldırım' and 'E 2481 Kaymak' from Central Anatolian region and '21' and '52' from Marmara regions using these primers (Supplementary Table 1). According to 46 self-compatible genotypes, considering the proportion of regional samples, the highest proportion (40%) with 13 out of 32 genotypes was assigned to the Marmara region and the lowest percentage with 3 out of 24 genotypes (12% of the region samples) allocated to the Central Anatolian region so, more attention should be paid to contrivance, regarding the commercial production and orchard design in this region. The results confirmed that the self-incompatibility feature tends to

increase in species, which is contrary to the former reports indicating that most cultivars were compatible (Mehlenbacher et al. 1991; Herrera et al. 2018).

Although much progress has been gained in understanding how the SI system works, many points of ambiguity remain still unclear. It has been recently illustrated that the *Pyrus* SI response begins with the uptake of the *S-RNase* protein from the style transmitter tissue by the pollen tube in a non-allelic specific manner. The entry of both non-self and self *S-RNases* into the pollen tube, support that the process of self-recognition takes place inside the pollen tube and subsequently results in inhibition of the non-self *S-RNases* activity (Goldraij et al. 2006; De Franceschi et al. 2012; Meng et al. 2014a; Meng et al. 2014b, Williams et al. 2015). In *Malus* and *Pyrus* species, the simultaneous attendance of multiple *SFBB* genes on the *S*-locus as the pollen *S*-detectors (Sassa et al. 2007) indicates that each of the *SFBB* proteins may detect one or more non-self *S-RNases*, targeting them for proteasome degradation (De Franceschi et al. 2012).

The recognition system has been proposed to occur via two models for GSI in *Pyrus* species. In the first model, the *SFBB* protein which identifies specifically the self *S-RNase*, relinquishing the self *S-RNase* intact to reject extension of the incompatible (self) pollen tube while mark all non-self *S-RNases* (Williams et al. 2015). In the second model which functions in the non-self-recognition way, the multiplex *SFBBs* that each distinguish and target a subset or unique non-self *S-RNases*, resulted in *S-RNase* decomposition so, the self *S-RNases* which are not prohibited led to the inhibition of self-incompatible pollen growth (Kubo et al. 2010).

It should be noted that in nature, true rejection of pollen is not only controlled genetically but also is affected by various external agents, like the environmental factors and pollination grade resulting in selfed seeds in self-incompatible varieties (Visser & Marcucci 1984). Interestingly, in cases where pollination occurs by non-self pollen, the evolvement possibility of ovule or fruit is higher than in case of self-pollination, which indicates the attendance of additional post-zygotic inhibitors that inhibit the selfed seed formation (Martin & Lee 1993). It is concluded that this abortion could be caused by recessive homozygous alleles combination or accumulation of low alleles that occur as a result of self-fertilization (Pannell & Labouche 2013) or due to the lower intake strength of plant sap for energy attainment.

Similarly, crosses between two semi-compatible lines could also lead to adversities. In semi-compatible crosses, half of the pollens bearing certain *S*-genotype are inhibited, resulting in a limited number of possible *S*-genotype compositions in the progeny. This "artificial selection" significantly affects the diversity of *S*-alleles, leading to a reduction in biological and genetic diversity as well as the loss of interesting traits in pear cultivars (Claessen et al. 2019).

According to the contents, examination of the pear SI mechanism reveals that in most commercial cultivars, the fruit set is highly depend on cross-pollination and successful fertilization. For these reasons, incompatibility is a system that nature has developed to prevent the accumulation of adverse homozygous allele damages and to provide a way to create varieties with diverse characteristics while maintaining viability over the years.

4. Conclusions

S-genotyping has made it possible to classify cultivars in relevant incompatibility groups considering their compatibility relations. Self-incompatibility is displayed when the pollen genotype corresponds to one of the pistil *S*-alleles. Therefore, self-incompatible lines bearing the similar *S*-alleles by classification in the identic incompatibility category, are considered to be inter-incompatible, while lines from other categories containing at least one different *S*-allele are accepted to be inter-compatible (Muñoz-Sanz et al. 2017).

It should be noted that standardization of the *S*-alleles identification criteria is essential in various laboratories, including the full sequencing of *S* alleles and utilization of the identic primer pairs. This will lead to easy *S*-allele identification without confusion and will provide valuable information for pear breeders (Herrera et al. 2018). Obtained results in this study make it possible to organize the incompatibility relationships between pear genotypes with former unknown pollination knowledge and provide the possibility to select suitable parents in designing new crosses in pear production and breeding programs. Besides, this work could be helpful for other *Rosaceae* fruit products with the same challenges encountered by pear.

References

- Akçay M E, Burak M, Kazan K, Yüksel Özmen C, Mutaf F, Bakir M, Ayanoğlu H & Ergül A (2014). Genetic analysis of Anatolian pear germplasm by simple sequence repeats. *Annals of Applied Biology* 164: 441-452. <https://doi.org/10.1111/aab.12113>
- Bagheri M & Ershadi A (2019). Self-incompatibility alleles in Iranian pear cultivars. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 27:101672. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101672>
- Broothaerts W, Verdoodt L, Keulemans J, Janssens GA & Broekaert WF (1996). The self-incompatibility gene in apple and determination of the *S*-genotype of apple cultivars by PCR. *Acta Horticulturae* 423: 103-109. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1996.423.13>
- Burke J M, Tang S, Knapp S & Rieseberg L H (2002). Genetic analysis of sunflower domestication. *Genetics* 162: 1257-1267

- Claessen H, Keulemans W, Van de Poel B & De Storme N (2019). Finding a Compatible Partner: Self-Incompatibility in European Pear (*Pyrus communis*): Molecular Control, Genetic Determination, and Impact on Fertilization and Fruit Set. *Frontiers in Plant Science* 10: 407. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00407>
- De Nettancourt D (2001). Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag).
- De Franceschi P, Dondini L & Sanzol J (2012). Molecular bases and evolutionary dynamics of self-incompatibility in the *Pyrinae* (*Rosaceae*). *Journal of Experimental Botany* 63: 4015-4032. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers108>
- Gandhi S D, Heesacker A F, Freeman C A, Argyris J, Bradford K & Knapp S J (2005). The self-incompatibility locus (S) and quantitative trait loci for self-pollination and seed dormancy in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 619-629. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-1934-7>
- Gao C, Yuan D Y, Yang Y, Wang B F, Liu D M & Zou F (2015). Pollen tube growth and double fertilization in *Camellia oleifera*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 140:1218. <https://doi.org/10.21273/JASHS.140.1.12>
- Goldraij A, Kondo K, Lee C B, Hancock C N, Sivaguru M, VazquezSantana S, Kim S, Philips T E, Cruz-Garcia F & McClure B (2006). Compartmentalization of *S-RNase* and HT-B degradation in self-incompatible Nicotiana. *Nature* 439: 805-810 <https://doi.org/10.1038/nature04491>
- Goldway M, Stern R, Zisovich A, Raz A, Sapir G, Schnieder & Nyska R (2012). The self-incompatibility system in *Rosaceae*: agricultural and genetic aspects. *Acta Horticulturae* 967: 77-82. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.967.7>
- Goldway M, Takasaki T, Sanzol J, Mota M, Zisovich A H, Stern R A & Sansavini S (2009). Renumbering the *S-RNase* alleles of European pears (*Pyrus communis* L.) and cloning the *S109 RNase* allele. *Scientia Horticulturae* 119: 417-422. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.08.027>
- Goldway M, Zisovich A, Raz A & Stern R A (2008). Understanding the gametophytic self-incompatibility system and its impact on European pear (*Pyrus communis* L.) cultivation. *Acta Horticulturae* 800: 109-118. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.800.9>
- Herrera S, Rodrigo J, Hormaza J I & Lora J (2018). Identification of self-incompatibility alleles by specific PCR analysis and *S-RNase* sequencing in apricot. *International Journal of Molecular Sciences* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19113612>
- Hiscock S J & Tabah D A (2003). The different mechanisms of sporophytic self incompatibility. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 358: 1037-1045. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1297>
- Igic B, Lande R & Kohn J R (2008). Loss of self-incompatibility and its evolutionary consequences. *International Journal of Plant Sciences* 169: 93-104. <https://doi.org/10.1086/523362>
- Ishimizu T, Inoue K, Shimonaka M, Saito T, Terai O & Norioka S (1999). PCR-based method for identifying the S-genotypes of Japanese pear cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 98(6): 961-967. <https://doi.org/10.1007/s001220051156>
- Ishimizu T, Sato Y, Saito T, Yoshimura Y, Norioka S, Nakanshi T & Sakiyama F (1996). Identification and partial amino acid sequences of seven *S-RNases* associated with self-incompatibility of the Japanese pear, *Pyrus pyrifolia* Nakai. *Journal of Biochemistry* 120: 326-334. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021417>
- Iwano M & Takayama S (2012). Self/non-self discrimination in angiosperm selfincompatibility. *Current Opinion in Plant Biology* 15: 78-83. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.09.003>
- Kakui H, Kato M, Ushijima K, Kitaguchi M, Kato S & Sassa H (2011). Sequence divergence and loss-of-function phenotypes of *S* locus *F-box* brothers genes are consistent with non-self recognition by multiple pollen determinants in self-incompatibility of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *The Plant Journal* 68: 1028-1038. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2011.04752.x>
- Kim H T, Hirata Y & Nou I S (2002). Identification of self incompatibility alleles by *S-RNases* sequencing and PCR-RFLP analysis in Korean-bred pear (*Pyrus pyrifolia*) strains. *Acta Horticulturae* 587:467-476. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.587.61>
- Kubo K, Entani T, Tanaka A, Wang N, Fields A M, Hua Z, Toyada M, Kawashima S, Ando T, Isogai A, Kao T & Takaya S (2010). Collaborative non-self recognition system in *S-RNase*-based self incompatibility. *Science* 330: 796-799. <https://doi.org/10.1126/science.1195243>
- Lefort F, Lally M, Thompson D & Douglas G C (1998). Morphological traits microsatellite fingerprinting and genetic relatedness of a stand of elite oaks (*Q. Robur* L.) at Tullyally, Ireland. *Silvae Genetica* 47: 5-6
- Martin M E & Lee T D (1993). Self pollination and resource availability affect ovule abortion in *Cassia fasciculata* (*Caesalpinaceae*). *Oecologia* 94: 503-509. <https://doi.org/10.1007/BF00566965>
- Mehlenbacher S A, Cocu V & Hough F L (1991). Apricots (*Prunus*). *Acta Horticulturae* 290: 65-110 <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1991.290.3>
- Meng D, Gu Z, Li W, Wang A, Yuan H, Yang Q & Li T (2014a). Apple MdABCF assists in the transportation of *S-RNase* into pollen tubes. *Plant Journal* 78: 990-1002. <https://doi.org/10.1111/tpj.12524>
- Meng D, Gu Z, Yuan H, Wang A, Li W, Yang Q, Zhu Y, Li T (2014b). The microtubule cytoskeleton and pollen tube golgi vesicle system are required for in vitro *S-RNase* internalization and gametic self-incompatibility in apple. *Plant & Cell Physiology* 55: 977-989. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu031>
- Muñoz-Sanz J V, Zuriaga E, Cruz-García F, McClure B & Romero C (2020) Self-(In)compatibility Systems: Target Traits for Crop-Production, Plant Breeding, and Biotechnology. *Frontiers Plant Science* 11: 195. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00195>
- Muñoz-Sanz J V, Zuriaga E, López I, Badenes M L & Romero C (2017). Self-(in)compatibility in apricot germplasm is controlled by two major loci, S and M. *BMC Plant Biology* 17: 82. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1027-1>
- Nashima K, Terakami S, Nishio S, Kunihisa M, Nishitani C, Saito T & Yamamoto T (2015). *S*-genotype identification based on allele-specific PCR in Japanese pear. *Breeding science* 65(3): 208-215. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.65.208>
- Okada K, Tonaka N, Taguchi T, Ichikawa T, Sawamura Y, Nakanishi T & Takeshi T Y (2011). Related polymorphic *F-box* protein genes between haplotypes clustering in the BAC contig sequences around the *S-RNase* of Japanese pear. *Journal of Experimental Botany* 62: 1887-1902. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq381>
- Orcheski B & Brown S (2012). A grower's guide to self and cross incompatibility in apple. *New York Fruit Quarterly* 20: 25-28.
- Pannell J R & Labouche A M (2013). The incidence and selection of multiple mating in plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 368: 20120051. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0051>
- Quinet M, Kelecom S, Raspe O & Jacquemart A L (2014). *S*-genotype characterization of 13 North Western European pear (*Pyrus communis* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae* 165: 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.10.023>
- Sanzol J (2009a). Pistil-function break down in a new *S*-allele of European pear, *S21*, confers self-compatibility. *Plant Cell Reports* 28: 457-467. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0645-3>
- Sanzol J (2009b). Genomic characterization of self-incompatibility ribonucleases in European pear cultivars and development of PCR detection for 20 alleles. *Tree Genetics Genomes* 5: 393-405. <https://doi.org/10.1007/s11295-008-0194-5>

- Sanzol J & Herrero M (2002). Identification of self-incompatibility alleles in pear cultivars (*Pyrus communis* L.). *Euphytica* 128:325-331. <https://doi.org/10.1023/A:1021213905461>
- Sanzol J & Robbins T P (2008). Combined analysis of *S* alleles in European pear by pollinations and PCR based *S*-genotyping: correlation between *S* phenotypes and *S*-*RNase* genotype. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 133: 213-224. <https://doi.org/10.21273/JASHS.133.2.213>
- Sanzol J, Sutherland B G & Robbins T P (2006). Identification and characterization of genomic DNA sequences of the *S*-ribonuclease gene associated with self-incompatibility alleles *S*-1 to *S*-5 in European pear. *Plant Breeding* 125: 513-518. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2006.01269.x>
- Sapir G, Stern R A, Shafir S & Goldway M (2008). *S*-*RNase* based Sgenotyping of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) and its implication on the assortment of cultivar couples in the orchard. *Scientia Horticulturae* 118: 8-13. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.05.004>
- Sassa H, Kakui H, Miyamoto M, Suzuki Y, Hanada T, Ushijima K, Kusaba M, Hirano H & Koba T (2007). *S* locus *F*-box brothers: multiple and pollen-specific *F*-box genes with *S* haplotype-specific polymorphisms in apple and Japanese pear. *Genetics* 175: 1869-1881. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.068858>
- Schneider D, Stern R A & Goldway M (2005). A comparison between semi and fully compatible apple pollinators grown under suboptimal conditions. *HortScience* 40: 1280-1282. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.40.5.1280>
- Takasaki T, Moriya Y, Okada K, Yamamoto K, Iwanami H, Bessho H & Nakanishi T (2006). cDNA cloning of nine *S* alleles and establishment of a PCR-RFLP system for genotyping European pear cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1543-1552. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0257-7>
- Visser T & Marcucci M C (1984). The interaction between compatible and self-incompatible pollen of apple and pear as influenced by their ratio in the pollen cloud. *Euphytica* 33: 699-704. <https://doi.org/10.1007/BF00021897>
- Williams J S, Der J P, de Pamphilis C W & Kao T-H (2014). Transcriptome analysis reveals the same 17 *S*-Locus *F*-box genes in two haplotypes of the self-incompatibility locus of *Petunia inflata*. *Plant cells* 26: 2873-2888. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.126920>
- Williams J S, Wu L, Li S, Sun P & Kao T-H (2015). Insight into *S*-*RNase*-based self-incompatibility in *Petunia*: recent findings and future directions. *Frontiers in Plant Science* 6: 41. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00041>
- Zisovich A H, Raz A, Stern R A & Goldway M (2010) Syrian pear (*Pyrus syriaca*) as a pollinator for European pear (*Pyrus communis*) cultivars. *Scientia Horticulturae* 125(3): 256-262. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.03.01>
- Zisovich A H, Stern R A, Shafir S & Goldway M (2004). Identification of seven *S*-alleles from the European pear (*Pyrus communis* L.) and the determination of compatibility among cultivars. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79: 101-106. <https://doi.org/10.1080/14620316.2004.11511720>
- Zisovich A H, Stern R A, Shafir S & Goldway M (2005). Fertilisation efficiency of semi and fully-compatible European pear (*Pyrus communis*) cultivars. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 80: 143-146. <https://doi.org/10.1080/14620316.2005.11511906>
- Zuccherelli S, Tassinari P, Broothaerts W, Tartarini S, Dondini L & Sansavini S (2002). *S*-allele characterization in self-incompatible pear (*Pyrus communis* L.). *Sexual Plant Reproduction* 15(3): 153-158. <https://doi.org/10.1007/s00497-002-0145-5>

Supplementary Table 1- *S*-allele compositions of pear cultivars

No.	Cultivar name	<i>S</i> -Genotype	PCR based- Compatibility status	Region
1	190 887 (3-2)	<i>S</i> ₆ <i>S</i> ₆	Semi-compatible	Unknown
2	190 887 (3-1)	<i>S</i> ₆ <i>S</i> ₈	Semi-compatible	Aegean
3	240 887 (3-1)	-	Compatible	Aegean
4	22	-	Compatible	Marmara
5	38	<i>S</i> ₆ <i>S</i> ₆	Semi-compatible	Marmara
6	A-48	-	Compatible	Unknown
7	133	<i>S</i> ₁ <i>S</i> ₆	Semi-compatible	Marmara
8	200 GFAE	<i>S</i> ₆ <i>S</i> ₆	Semi-compatible	Black Sea
9	207 BF(G)	-	Compatible	Black Sea
10	221 GFAE (G)	<i>S</i> ₆ <i>S</i> ₈	Semi-compatible	Black Sea
11	223 GFAE (G)	<i>S</i> ₆ <i>S</i> ₆	Semi-compatible	Black Sea
12	A-2406	<i>S</i> ₁ <i>S</i> ₆	Semi-compatible	Unknown
13	Azdavay	<i>S</i> ₆ <i>S</i> ₆	Semi-compatible	Black Sea
14	Bağ (G)	-	Compatible	Black Sea
15	Bal Armut (Malatya)	<i>S</i> ₆ <i>S</i> ₆	Semi-compatible	Unknown
16	Bey Armudu	<i>S</i> ₆ <i>S</i> ₆	Semi-compatible	Unknown
17	Çankaya1	<i>S</i> ₆ <i>S</i> ₆	Semi-compatible	Unknown
18	Cennet (G)	<i>S</i> ₆ <i>S</i> ₆	Semi-compatible	Black Sea
19	E 2473 Cinci	<i>S</i> ₆ <i>S</i> ₈	Semi-compatible	Central Anatolian
20	E 2501 Eğrişap	<i>S</i> ₆ <i>S</i> ₆	Semi-compatible	Central Anatolian
21	E 2507 Pamukap	<i>S</i> ₁ <i>S</i> ₁	Semi-compatible	Central Anatolian
22	E Rize	<i>S</i> ₆ <i>S</i> ₆	Semi-compatible	Unknown
23	Fakaz (G)	<i>S</i> ₁ <i>S</i> ₆	Semi-compatible	Black Sea
24	Gümüşhane (G)	<i>S</i> ₁ <i>S</i> ₆	Semi-compatible	Black Sea
25	Gürpınar (G)	<i>S</i> ₁ <i>S</i> ₆	Semi-compatible	Black Sea
26	İğnesi (Malatya)	<i>S</i> ₇ <i>S</i> ₇	Semi-compatible	Unknown
27	İncir (Malatya)	-	Compatible	Unknown
28	Kantartopu	<i>S</i> ₁ <i>S</i> ₁	Semi-compatible	Black Sea

Supplementary Table 1 (Continue)- S-allele compositions of pear cultivars

No.	Cultivar name	S-Genotype	PCR based- Compatibility status	Region
29	Karagöynük	-	Compatible	Marmara
30	Karpuz	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Black Sea
31	Kiraz	S ₁ S ₁	Semi-compatible	Black Sea
32	Küpdüşen (Malatya)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Unknown
33	Küre (G)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Black Sea
34	Laliye	S ₁ S ₁	Semi-compatible	Marmara
35	Malatya Limon	S ₁ S ₆	Semi-compatible	Unknown
36	Mis (G)	S ₁ S ₁	Semi-compatible	Black Sea
37	Turşu (G)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Black Sea
38	174W (G) D.dAngulume	S ₁ S ₁	Semi-compatible	Unknown
39	E Santa Maria	-	Compatible	Unknown
40	Williams	S ₁ S ₆	Semi-compatible	Unknown
41	Akça	S ₁ S ₁	Semi-compatible	Marmara
42	E. Buzbağ	-	Compatible	Marmara
43	Çiçek	-	Compatible	Marmara
44	Göksulu	S ₁ S ₆	Semi-compatible	Marmara
45	Göksulu (Malatya)	S ₁ S ₁	Semi-compatible	Marmara
46	Malatya (Malatya)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Unknown
47	205 AF (G)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Black Sea
48	188 BK (G)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Black Sea
49	130 887 (1-3)	S ₁ S ₁	Semi-compatible	Unknown
50	130 887 (3-7)	S ₁ S ₆	Semi-compatible	Unknown
51	140 887 (1-1)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Unknown
52	140 887 (2-3)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
53	150 887 (1-3)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
54	150 887 (1-5)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Unknown
55	150 887 (2-3)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
56	172 887 (2-2)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
57	190 887 (2-6)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Unknown
58	180 887 (4-3)a	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
59	180 887 (9-7)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
60	190 887 (3-3)	S ₁ S ₆	Semi-compatible	Unknown
61	190 887 (3-5)	S ₁ S ₆	Semi-compatible	Aegean
62	190 887 (3-7)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
63	190 887 (4-1)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
64	190 887 (6-2)	S ₁ S ₆	Semi-compatible	Aegean
65	200 887 (2-1)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
66	200 887 (2-3)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
67	200 887 (2-4)	S ₁ S ₆	Semi-compatible	Aegean
68	200 887 (11-6)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
69	210 887 (2-2)	S ₁ S ₁	Semi-compatible	Aegean
70	210 887 (2-3)	S ₁ S ₆	Semi-compatible	Aegean
71	210 887 (4-4)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Unknown
72	210 887 (4-6)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
73	220 887 (2-3)	S ₁ S ₆	Semi-compatible	Aegean
74	220 887 (3-3)	S ₁ S ₆	Semi-compatible	Aegean
75	230 887 (3-3)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
76	240 887 (3-3)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
77	A33	S ₁ S ₆	Semi-compatible	Unknown
78	A 129	S ₁ S ₆	Semi-compatible	Unknown
79	A 2401	S ₆ S ₇	Semi-compatible	Unknown
80	A 2407	-	Compatible	Unknown
81	A 2409	S ₁ S ₆	Semi-compatible	Unknown
82	A 2411	-	Compatible	Unknown
83	A 2412	S ₁ S ₆	Semi-compatible	Aegean
84	E 2470 Kokmuş Armut	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Unknown
85	E 2444 Arpa	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
86	E 2462 Bildircin	S ₆ S ₇	Semi-compatible	Central Anatolian
87	E2480 Kızıl Bildircin	S ₁ S ₆ S ₇	Incompatible	Central Anatolian
88	E 2481 Kaymak	S ₁ S ₆ S ₈	Incompatible	Central Anatolian
89	E 2493 Kışlık Şalgam	S ₁ S ₆	Semi-compatible	Central Anatolian
90	E 2516	S ₁ S ₆	Semi-compatible	Central Anatolian
91	E 2539 Baymaz	S ₁ S ₆	Semi-compatible	Central Anatolian
92	E 2540 Dalkıran	S ₁ S ₆	Semi-compatible	Unknown
93	E 2542 Ağa	S ₁ S ₆	Semi-compatible	Central Anatolian
94	E 2547 Armut	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Central Anatolian

Supplementary Table 1 (Continue)- S-allele compositions of pear cultivars

No.	Cultivar name	S-Genotype	PCR based- Compatibility status	Region
95	E 2556 Hocacul	-	Compatible	Unknown
96	E 2557 Mustafabey	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Central Anatolian
97	E Ankara	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Central Anatolian
98	E Giresun	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Central Anatolian
99	10	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Marmara
100	13	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Unknown
101	14	S ₁ S ₆	Semi-compatible	Unknown
102	18	S ₁ S ₁	Semi-compatible	Marmara
103	19	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Unknown
104	20	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Marmara
105	21	S ₁ S ₆ S ₈	Incompatible	Marmara
106	30	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Marmara
107	37b	S ₁ S ₁	Semi-compatible	Marmara
108	41	S ₁ S ₆	Semi-compatible	Unknown
109	43	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Marmara
110	136	-	Compatible	Marmara
111	139	S ₁ S ₁	Semi-compatible	Marmara
112	231 BC	S ₁ S ₆	Semi-compatible	Unknown
113	P5-9	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Unknown
114	P5-23	-	Compatible	Unknown
115	Thompson (Malatya)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Unknown
116	Andre Desportes	-	Compatible	Unknown
117	150 887 (1-1)	-	Compatible	Aegean
118	E 2545	-	Compatible	Unknown
119	140 887 (2-5)	-	Compatible	Unknown
120	140 887 (2-2)	S ₆ S ₇	Semi-compatible	Aegean
121	E 2533 Sarı Armut	-	Compatible	Central Anatolian
122	E 509 Kış Armutu	-	Compatible	Central Anatolian
123	E 224 K. Armut	S ₁ S ₆	Semi-compatible	Central Anatolian
124	52	S ₁ S ₆ S ₇	Incompatible	Marmara
125	200 887 (2-1)b	-	Compatible	Aegean
126	210 887 (4-5)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Unknown
127	P5 11	-	Compatible	Unknown
128	64	-	Compatible	Marmara
129	44	-	Compatible	Marmara
130	134	-	Compatible	Marmara
131	E 2537 Bulap	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Central Anatolian
132	220 887 (3-1)	-	Compatible	Unknown
133	213 GFAE	-	Compatible	Karadeniz
134	236 GFAE	-	Compatible	Karadeniz
135	A 2404	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Unknown
136	190 887 (3-6)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Unknown
137	31	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Marmara
138	190 887 (2-3)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
139	16	-	Compatible	Marmara
140	P5-2	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Unknown
141	14	-	Compatible	Unknown
142	A 129	S ₁ S ₆	Semi-compatible	Unknown
143	P 522	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Unknown
144	A 2410	S ₁ S ₆	Semi-compatible	Unknown
145	E 2462 Bildircin	-	Compatible	Central Anatolian
146	E 2480 Kızıl Bildircin	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Mediterranean
147	E 2542 Ağa	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Central Anatolian
148	150 887 (3-1)	-	Compatible	Aegean
149	21	-	Compatible	Marmara
150	190 887 (1-1)	-	Compatible	Aegean
151	200 887 (2-1)	S ₁ S ₁	Semi-compatible	Aegean
152	E Ankara	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Central Anatolian
153	220 887 (2-3)	S ₇ S ₇	Semi-compatible	Aegean
154	Giresun	S ₇ S ₇	Semi-compatible	Unknown
155	150 887 (1-1)	S ₆ S ₇	Semi-compatible	Aegean
156	240 887 (3-2)	S ₇ S ₇	Semi-compatible	Aegean
157	200 887 (2-1)a	-	Compatible	Aegean
158	140 887 (2-1)	S ₆ S ₆	Semi-compatible	Aegean
159	140 887 (2-2)	-	Compatible	Aegean
160	265 GFAE	-	Compatible	Karadeniz

Supplementary Table 1 (Continue)- S-allele compositions of pear cultivars

No.	Cultivar name	S-Genotype	PCR based- Compatibility status	Region
161	E 2533 Sarı Armut	S_6S_8	Semi-compatible	Central Anatolian
162	E 2509 K. Armut	S_1S_6	Semi-compatible	Unknown
163	190 887 (3-4)	S_6S_6	Semi-compatible	Unknown
164	200 887 (2-1)b	-	Compatible	Aegean
165	E 2525 Ekşi Armut	S_6S_6	Semi-compatible	Central Anatolian
166	44	S_6S_6	Semi-compatible	Marmara
167	134	S_6S_6	Semi-compatible	Marmara
168	E 2537 Bulap	S_6S_6	Semi-compatible	Central Anatolian
169	220 887 (3-1)	S_6S_6	Semi-compatible	Unknown
170	235 P	-	Compatible	Unknown
171	A 2404	-	Compatible	Unknown
172	31	S_1S_6	Semi-compatible	Marmara
173	M 2404	-	Compatible	Unknown
174	190 887 (2-3)	S_7S_7	Semi-compatible	Aegean
175	180 887 (4-3)b	S_6S_6	Semi-compatible	Aegean
176	220 887 (4-1)	S_6S_6	Semi-compatible	Aegean
177	45	-	Compatible	Marmara
178	32	-	Compatible	Marmara
179	138	-	Compatible	Marmara
180	A 135	-	Compatible	Unknown