

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**DOMATESTE *FUSARIUM OXYSPORUM F.SP. RADİCİS-
LYCOPERSİCİ*'YE KARŞI DAYANIKLILIK İÇİN
MOLEKÜLER İŞARETLEYİCİLERİN BELİRLENMESİ**

Aylin KABAŞ (DEMİRELLİ)

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Tez Danışmanları:

Doç. Dr. Hülya İLBİ

Dr. Nedim MUTLU

Bornova-İZMİR

II

Aylin Kabaş (Demirelli) tarafından Doktora tezi olarak sunulan “Domateste *Fusarium oxysporum f. sp. radidis-lycopersici*'ye Karşı Dayanıklılık İçin Moleküler İşaretleyicilerin Belirlenmesi” başlıklı bu alışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 11/09/2008 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

-

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı :Prof. Dr. Ersin ONOĞUR

Raportör Üye:Doç. Dr. Hülya İLBİ

Üye :Prof. Dr. Dursun EŐİYOK

Üye :Doç. Dr. Anne FRARY

Üye :Doç. Dr. Sami DOĞANLAR

ÖZET**DOMATESTE *FUSARIUM OXYSPORUM F.SP. RADICIS-
LYCOPERSICI*'YE KARŞI DAYANIKLILIK İÇİN
MOLEKÜLER İŞARETLEYİCİLERİN BELİRLENMESİ**

(DEMİRELLİ) KABAŞ, Aylin

Doktora Tezi, Bahçe Bitkileri Bölümü

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Hülya İLBI

Eylül 2008,

Fusarium kök ve kök boğazı çürüklüğü, *Fusarium oxysporum f.sp. radialis lycopersici* (FORL), domateste önemli verim kaybına sebep olmaktadır. Bu çalışmada, FORL'a dayanıklılık sağlayan tek dominant gen'e (*Frl*) moleküler ıslahta kullanılabilecek yakınlık ve özellikle moleküler işaretleyicilerin belirlenmesi araştırılmıştır. Dayanıklı 'Fla. 7781' hattı ile hassas '560' nolu hat melezlenmiş ve Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü (BATEM)'de F₁, F₂ ve BC₁ populasyonları elde edilmiştir. Ebeveynler, F₂ ve BC₁ bitkileri FORL izolatıyla testlenmiştir. *Frl* ile ilişkili moleküler işaretleyici belirlemek için, domatesin 9. kromozomunda olduğu bilinen 7 SSR ve 9 Cos II işaretleyicilerine ilaveten 247 SRAP, 419 dayanıklı gen analogları (RGA) ve 576 Cos II- SRAP primer kombinasyonu kullanılmıştır. Dayanıklı ile hassas ebeveynler ve bulklar arasında polimorfizm tespiti için Bulk Segregant Analizi (BSA) yapılmıştır. Toplam 2925 markır lokusundan, 644'u SRAP ile 18'i SSR ile 1336'sı RGA lokus, 9'u Cos II ile ve 918

adedi de Cos II- SRAP kombinasyonundan elde edilmiştir. Ancak incelenen lokuslar bakımından Cos II haricinde dayanıklı ve hassas ebeveynler ile bulkları arasında polimorfizm belirlenememiştir. Cos II işaretleyicileri ile 12 farklı kesim (restriction) enzimi ile kesilerek dayanıklı- hassas ebeveynler arasında dayanıklılıkla ilişkili polimorfik olanlar belirlenmiştir. Bunlardan C2_At3g63200 Cos II işaretleyicisi BsuRI, VspI, TaqI, RsaI, NdeI, AclI, Dpn I, Hin6I, HhaI, AsuII, MaeI enzimleriyle ebeveynler arasında polimorfizm oluşturmuştur. Bu kombinasyonlar bulkları oluşturan bireylerde test edildiğinde C2_At3g63200 Cos II işaretleyicisi TaqI enzimi ile kesimi *Frl* ile ilişkili olabileceği düşünülen kolay skor edilebilen ko-dominant polimorfizm göstermiştir. *Frl* geniyle ilişkili moleküler işaretleyici(ler) bu hastalığa karşı moleküler ıslaha geçişi ve dayanıklı çeşit geliştirme zamanını kısaltacağı düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Domates, *fusarium oxysporum f.sp.radicis lycopersici*, MAS, *Frl*

ABSTRACT**FINE MAPPING OF *FUSARIUM OXYSPORUM F.SP.*
RADICIS LYCOPERSICI (FRL) RESISTANCE IN TOMATO**

(DEMİRELLİ) KABAŞ, Aylin

Ph D, Department of Horticulture

Supervisor: Doç. Dr. Hülya İLBİ

September 2008

Fusarium crown and root rot, incited by *Fusarium oxysporum f.sp. radialis lycopersici* (FORL), causes significant yield losses in tomato. The objective of this study was to develop a closely linked molecular markers to single dominant resistance gene, *Frl*, against FORL for use in marker assisted selection (MAS). Resistant ‘Fla. 7781’ and susceptible ‘560’ were crossed to form mapping population. F₁, F₂, and BC₁ were developed Batı Akdeniz Agricultural Research Institute (BATEM), Antalya. Parents, F₂ and BC₁ plants were tested with known FORL isolate. In addition to 7 SSR and 9 Cos II markers located on chromosome 9, we also used 247 SRAP, 419 RGA and 576 Cos II-SRAP combinations. Resistant and susceptible parents and bulks were screened using Bulk Segregant Analysis (BSA). Of the 2925 marker locus, 644 was SRAP, 18 SSR, 1336 RGA, 9 Cos II and 918 Cos II-SRAP combinations. Cos II markers were cut with 12 restriction enzymes and C2_At3g63200 Cos II marker gave co-dominant polymorphisms when cut with BsuRI, VspI, TaqI, RsaI, NedI, AdeI, Dpn I, Hin6I, HhaI, AsuII, MaeI enzymes. This marker and TaqI enzyme

combination showed a easily scorable co-dominant polymorphism between resistant and susceptible individuals. To develop molecular markers tightly linked to *Frl* will shorten the time, and to the development of resistant varieties.

Keywords: Tomato, *fusarium oxysporum f.sp.radicis lycopersici*, MAS, *Frl*

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmamda, tez konumun belirlenmesinde ve denemem boyunca bana destek ve yönlendirmelerde bulunan danışman hocalarım, Doç. Dr. Hülya İLBİ ve Dr. Nedim MUTLU'ya teşekkür ederim. Çalışmam boyunca bana her konuda destek olan ve tezimin yazım aşamasında da yardımlarını esirgemeyen eşim Zir.Yük.Müh. Önder KABAŞ'a, tezimin arazi ve laboratuvar aşamalarını yürüttüğüm Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü (BATEM) Müdürlüğü'ne ve laboratuvarlarından faydalandığım Tohum Teknolojisi Uygulama ve Araştırma Merkezi (TOTEM) Müdürlüğü'ne teşekkür ederim. Arazi çalışmalarında yardım eden Asu OĞUZ, Sinan ZENGİN'e, laboratuvar çalışmalarında yardım ve desteklerini esirgemeyen Dr. H. Filiz BOYACI, Dr. Münevver Göçmen, Dr. Hatice İKTEN, Dr. Abdullah ÜNLÜ, Özlem YEŞİLOVA'ya ayrıca Sebzeçilik ve Bitki Koruma Bölümünde çalışan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim. Manevi desteklerini esirgemeyen KABAŞ ve DEMİRELLİ ailelerine ve beni doktora eğitimi yapma konusunda her zaman destekleyen sevgili babama, doktora tez projeme maddi destek veren TÜBİTAK'a, tez çalışmam boyunca beni sabır ve özlemlerle bekleyen, biricik kızım İpek'e teşekkür ederim

İÇİNDEKİLERSayfa

ÖZET	II
ABSTRACT.....	VI
TEŞEKKÜR.....	IX
İÇİNDEKİLER	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XIV
SİMGELER VE KISALTMALAR	XV
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	9
2.1. <i>Fusarium oxysporum</i> İle İlgili Çalışmalar	9
2.2. Moleküler İşaretleyicilerin Kullanılması İle ilgili Çalışmalar	15
2.2.1. Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP) ile İlgili Çalışmalar	17
2.2.2. Simple Sequence Repeat (SSR) ile İlgili Çalışmalar	24
2.2.3. Resistance Gene Analogue (RGA) ile İlgili Çalışmalar	28
2.2.4. Conserved Ortholog Set II (Cos II) ile İlgili Çalışmalar	30
2.3. Domateste Dayanıklılık Çalışmalarında Moleküler İşaretleyicilerinin Kullanılması.....	32
2.4. Bulk segregant Analizi (BSA)	39
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	43
3.1. Materyal	43
3.1.1. Bitkisel Materyal	43
3.1.2. Fungal Materyal:.....	49
3.2. Yöntem	50
3.2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi	50
3.2.2. Haritalama Populasyonlarının Oluşturulması.....	51
3.2.3. Dayanıklılık Testlemelerinin Yapılması:.....	55

3.2.3.1. Spor Süspansiyonunun Hazırlanması.....	55
3.2.3.2. İnokülasyon.....	58
3.2.4. Dayanıklılık Geninin Moleküler Olarak Haritalanması.....	61
3.2.4.1. DNA İzolasyonu.....	61
3.2.4.2. Bulked Segregant Analysis (BSA).....	64
3.2.4.3. Moleküler İşaretleyicilerin Kullanımı.....	65
3.2.4.3.1. Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP)	66
3.2.4.3.2. Simple Sequence Repeat (SSR).....	68
3.2.4.3.3. Resistance Gene Analogue (RGA).....	69
3.2.4.3.4. Conserved Ortholog Set II (Cos II).....	72
3.2.4.3.4.1. Cos II PCR Ürünlerinin DNA Kesim Enzimleriyle Kesimi.....	74
3.2.4.3.4.2. Cos II (Conserved Ortholog Set II) ve SRAP Kombinasyonu.....	78
3.2.4.4. PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi.....	79
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	78
4.1. <i>Fusarium oxysporum f.sp. radici lycopersici</i> (FORL) İzolatı ile Testlemelerin Yapılması ve Dayanıklılığın Kalıtımı.....	78
4.2. Moleküler İşaretleyici Bulguları.....	79
4.2.1. SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism) Bulguları.....	79
4.2.2. SSR (Simple Sequence Repeat) Bulguları.....	81
4.2.3. RGA (Resistance Gene Analogue) Bulguları.....	82
4.2.4. Conserved Ortholog Set II (Cos II) Bulguları.....	85
4.2.4.1 Conserved Ortholog Set II (Cos II) ve SRAP Kombinasyon Bulguları.....	90
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	96
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	102
ÖZGEÇMİŞ.....	128

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1a-b. <i>Fusarium oxysporum f.sp.radicis lycopersici</i> 'nin domateste meydana getirdiği belirtiler.....4	4
3.1. Dayanıklı ebeveyn (Fla. 7781)'in pedigreesi (Scott ve Jones., 2000)45	45
3.2. a; dayanıklı ebeveyn meyve resmi (Fla. 7781) b; hassas ebeveyn meyve resmi (560),.....46	46
3.3 a; dayanıklı ebeveyn bitki resmi (Fla. 7781)46	46
3.3. b; hassas ebeveyn bitki resmi (560),.....47	47
3.4 a, b Hassas ve dayanıklı ebeveynlerin testlenmesi50	50
3.5. Melezleme şeması.....52	52
3.6. a-b; Emaskülasyon işlemi, c; polen verme, d; kendileme ve vibratör yardımı ile titrasyon.....53	53
3.7 F ₁ bitkilerinin sera içindeki görünümü54	54
3.8. Dayanıklı ve hassas ebeveynin melezlenmesi ile elde edilen F ₁ meyvelerinin görüntüsü.....55	55
3.9. Testlemeye hazır inokülasyon56	56
3.10. Testlemeye hazır fideler ve inokülasyon59	59
3.11. Testleme serasından görünüm60	60
3.12. Testleme süresince sıcaklık-nem değerleri60	60
3.13. Testlemeden 9 gün sonraki görüntüler.....61	61
3.14. Bitki örneklerinin sıvı azot ile muamele edilmesi63	63
3.15. DNA görüntüsü.....63	63
3.16. Domatesin 9. kromozomunda kullandığımız işaretleyicilerin yerleri65	65
4.1 me3-em19 arası RP, RB, SP, SB81	81

- 4.2 Dayanıklı Fla.7781, dayanıklı bulk, hassas 560 ve hassas bulk ile RGA(6-23, 25, 26, 28 ve 5-21 nolu kombinasyonlar) primerlerinin %2.5'lik agaroz jeldeki görüntüsü..... 83
- 4.3. C2_At2g29210, C2_At1g03360, C2_At2g47890, C2_At3g02680, C2_At3g63190, C2_At3g48120, C2_At1g02910, C2_At3g63200, C2_At4g02580 Cos II işaretleyicileri ve Hin6I, Dpn I, MaeI, Ase I enzimleri ile dayanıklı 'Fla. 7781' ve hassas '560' ebeveynlerinin kesim görüntüsü..... 87
- 4.4. C2_At2g29210, C2_At1g03360, C2_At2g47890, C2_At3g02680, C2_At3g63190, C2_At3g48120, C2_At1g02910, C2_At3g63200, C2_At4g02580 Cos II işaretleyicileri ve TaqI, AsuII, RsaI, HhaI enzimleri ile dayanıklı 'Fla. 7781' ve hassas '560' ebeveynlerinin kesim görüntüsü..... 88
- 4.5 C2_At2g29210, C2_At1g03360, C2_At2g47890, C2_At3g02680, C2_At3g63190, C2_At3g48120, C2_At1g02910, C2_At3g63200, C2_At4g02580 Cos II işaretleyicileri ve NedI, VspI, TruII, BsuRI enzimleri ile dayanıklı 'Fla. 7781' ve hassas '560' ebeveynlerinin kesim görüntüsü..... 89
- 4.6 C2_At3g63200 Cos II işaretleyicisi ile TaqI enziminin, 10 hassas ve 10 dayanıklı birey ile dayanıklı 'Fla. 7781' ve hassas '560' ebeveynlerinin kesim görüntüsü..... 90
- 4.7 *Fusarium oxysporum f. sp. radidis lycopersici*'ye dayanıklı 'Fla. 7781' ve hassas '560' ebeveynler Cos II işaretleyicileri C2_At1g02910 (forward ve reverse), Cos II C2_At3g63200 (forward)ile SRAP primerleri Em1- Em16 arası kombine edilmiş, SRAP PCR şartları kullanılmıştır. 94

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Dayanıklı ve hassas ebeveynin bitki ve yaprak özellikleri	48
3.2. Dayanıklı ve hassas ebeveynin meyve özellikleri	48
3.3. Stok süspansiyon çözeltisi bileşenleri.....	57
3.4. Süspansiyon çözeltisi bileşenleri	58
3.5 CTAB Ekstraksiyon Buffer	64
3.6. SRAP Format primerleri ve dizilimleri.....	66
3.7.SRAP Reserve primerleri ve dizilimleri	67
3.8.SSR primerleri, dizilimleri ve kromozom üzerindeki yeri	68
3.9. RGA primerleri ve dizilimleri	70
3.10. Cos II primerleri ve dizilimleri	73
3.11.DNA kesiminde kullanılan enzimler	74
4.1. <i>Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici</i> ile testlenen F ₁ , F ₂ , BC1 ve dayanıklı- hassas ebeveynlerin gösterdikleri reaksiyonlarının X ² test sonuçları	78
4.2. SRAP primer kombinasyonlarının PCR sonuçları.....	80
4.3.. SSR primerleri ile yapılan PCR sonuçları ve elde edilen band sayılar.....	82
4.4. RGA kombinasyonlarının PCR sonuçları.....	84
4.5. Cos II işaretleyicileri ve 12 farklı enzim ile kesim sonrası PCR ve polimorfizm sonuçları	86
4.6a. C2_At2g29210, C2_At1g03360, C2_At2g47890, C2_At3g02680, C2_At3g63190, C2_At3g48120, C2_At1g02910, C2_At3g63200, C2_At4g02580 ve SRAP kombinasyonlarının PCR sonuçları	92
4.6b C2_At2g29210, C2_At1g03360, C2_At2g47890, C2_At3g02680, C2_At3g63190, C2_At3g48120, C2_At1g02910, C2_At3g63200, C2_At4g02580 ve SRAP kombinasyonlarının PCR sonuçları	93

SİMGELER VE KISALTMALAR**Kısaltmalar**

FORL	<i>Fusarium oxysporum f. sp. radicis lycopersici</i>
FOL	<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>
MAS	Marker Assisted Selection
PCR	Polymerase Chain Reaction
DNA	Deoksiribonükleik Asit
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeats
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
SRAP	Sequence Related Amplified Polymorphism
RGA	Resistance Gene Analog
Cos II	Conserved Ortholog Set II
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
BC	Backcross
QTL	Quantitative Trait Loci
cM	Centi Morgan
VCG	Vegetative Compatibility Group

1. GİRİŞ

Domates (*Solanum lycopersicum L.*), patlıcangiller (Solanaceae) familyasından anavatanı Güney ve Orta Amerika olan tek yıllık bir bitki olup, Amerika'dan Avrupa'ya, buradan da tüm dünyaya yayıldığı bilinmektedir. Domatesin 100 g'ında 0.55 mg vitamin B6, 1700 IU vitamin A, 0.10 mg vitamin B1 ve 21 mg vitamin C bulunmaktadır (Sevgican, 1999). C vitamini antioksidan özellikleri bilinen vitamindir ve domates bu vitaminin önemli kaynaklarından biridir.

Bunların yanında domates yüksek oranda antioksidan potansiyele sahip likopen (2722 µg) içermektedir. Özellikle son dönemlerde tüketicilerde sağlıklı ve dengeli beslenme bilincinin oluşması temel ürün olarak domatesi karşımıza çıkarmaktadır. Dünya'da ve ülkemizde en çok üretilen domates, taze tüketiminin yanı sıra endüstriyel kullanım (konserve, salça, ketçap, turşu vb) açısından da önemli bir yer teşkil etmektedir.

İklim değişikliklerine karşı dayanıklı olması yanında kolay yetiştiriciliğiyle de birçok üretici tarafından tercih edilen domates, toplam ekiliş alanı, üretimi ve ticareti açısından da Türkiye'de yaş sebze grubunun en önemli ürünlerinden birisini oluşturmaktadır (Cevri, 2008; Gülistan, 2006).

Üretim miktarı açısından incelendiğinde Türkiye; Çin, Hindistan ve ABD' den sonra Dünyada dördüncü sırada yer almaktadır. Dünya'da üretilen 125 milyon ton domatesin %7,9'u Türkiye'de üretilmektedir (FAO, 2006). Ülkemizdeki toplam 1 048 803 ha sebze alanının %24.8'i

domates üretimi için kullanılmaktadır. 2005 yılında toplam 9 700 000 ton domates üretimi gerçekleştirilmiştir (TÜİK, 2006). Bu miktar açıkta ve örtüaltında yapılan yetiştiricilik alanlarını kapsamaktadır. Bu yetiştiricilik şekilleri bölgelere göre farklılık göstermektedir. Marmara ve Ege Bölgeleri sanayiye yönelik üretim yaparken, Akdeniz Bölgesinde taze tüketime yönelik örtüaltı yetiştiriciliği yoğunlaşmıştır. Örtüaltı domates yetiştiriciliğinde 2 067 738 ton ile domates ilk sırada yer alırken bunu sırasıyla hıyar, karpuz, biber ve patlıcan takip etmektedir (Özalp ve Aktaş, 2008).

Ülkemizde ve dünyada üretim ve tüketim açısından önemli bir yer teşkil eden domatesin yetiştiriciliği esnasında hastalık ve zararlılar ciddi bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Domateste yaklaşık olarak 200'den fazla hastalık bulunmaktadır. Bunlar virüsler, bakteriler, nematodlar ve funguslardır (Agrios, 1988; Jones, 1991).

Hastalık etmeni olan *Fusarium* türleri doğada en yaygın fungus türleridir. Her türlü toprak içinde, organik materyallerin üzerinde farklı formlarda yaşarlar. Simptomları, bitkilerin organları ve türlerine göre farklılık göstermektedir. En çok görünür simptomsu da kök çürüklüğü ve solgunluktur (Özer ve Soran, 1991).

Fusarium türleri içinde domateste en yaygın görüleni *Fusarium oxysprum*'dur. *Fusarium oxysporum* domateste *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (FOL) ve *f. sp. radialis lycopersici* (FORL) olarak görülmektedir. Bunlar, domatese benzer konukçu patojen olmalarına rağmen ayrı formda hastalıklarıdır. FOL solduruken, FORL kök ve kök boğazı çürümelerine neden olmaktadır (Attitalla et al., 2004).

FOL'un neden olduğu solgunluk önemli verim kayıplarına neden olmakta, şiddeti ise özellikle seralarda ekonomik nedenlerle herhangi bir münavebe programı uygulanmaması sonucu duyarlı çeşitlerle yıldan yıla daha çok artmaktadır (Yücel, 1989; Sherf and Machab, 1986). Bu fungus köklerdeki vasküler sistemi etkiler, su transferini engelleyerek bitkilerde hızlı ve ani ölümlere neden olmaktadır. Hastalığın görüldüğü bitkilerde yapraklar önce kurur daha sonra da solma ve ölümler ortaya çıkmaktadır (McGrath et al. 1987, Malhotra and Vashistha, 1993). FOL'un 3 ırkının olduğu bildirilmiştir (Bohn and Tucker, 1939; Alexander and Tucker, 1945; Grattidge and O'Brien, 1982; Volin and Jones, 1982). Dayanıklılığın kalıtımı ırka özel olarak tek dominant gen ya da birden fazla dominant gen tarafından sağlanmaktadır. Hastalığın 2. ırkına dayanıklılık sağlayan *I-2* geni, domatesin 11.kromozomunda yer alıp, kaynağı *Solanum Pimpinellifolium*'dan sağlanmıştır. *I-1* ve *I-3* geni domatesin 7. kromozomunda yer almakta ve ırk 1 ve 3'e karşı dayanıklılığı sağlamaktadır (Stall ve Walter, 1965).

FORL ise önemli toprak kökenli patojen olup, fungusun bazı form specialleri (f.sp.) konukçuya özelleşmiştir. *F. oxysporum f.sp. radicis lycopersici* (FORL), domatesin kök ve kök boğazı çürüklüğü etmenidir ve ilk olarak Japonya'da bulunmuştur. Daha sonra Amerika, Kanada, Avrupa ve İsrail'i de içeren birçok ülkede de tespit edilmiş olup, 1988 yılında İngiltere'de kaydedilmiştir (Omar et al., 2006).

Türkiye'de ise bu patojen ilk olarak Can vd., (2004) tarafından saptanmıştır. Hastalığın uzun zamandır domates üretilen bölgelerde çok yaygın olduğu ve önemli verim kayıplarına neden olduğu da bilinmektedir.

Hastalığın erken semptomları domates fidelerinde bodurlaşma, sararma, olgunlaşmamış kotiledonlar ve yaprakların azalması olarak görünürken, ileri semptomlarda kök çürümeleri, solma ve ölümler olmaktadır (Roberts et al., 2000). Kök bölgesindeki çürüklük ve gövde iletim demetlerindeki nekroz, toprak yüzeyinden en fazla 15-30 cm yüksekliğe kadar çıkmaktadır (Şekil 1 a, b). Etmen bitkinin toprak yüzeyine yakın gövde üzerinde beyaz- pembe sporulasyon vermektedir (Can vd., 2003).



Şekil 1 a-b. *Fusarium oxysporum f.sp. radicis lycopersici*'nin domateste meydana getirdiği semptomlar (Orijinal resim)

Bitkide görülen solgunluk öncelikle günün en sıcak zamanında meydana gelmekte ve bitki gece yeniden iyileşmektedir. Ancak enfekte bitkilerde ilerleyen aşamalarda solgunluğun şiddeti artmakta ve ölümler görülmektedir (Roberts et al., 2000).

Fusarium solgunluğunun (*Fusarium wilt*) tersine, kök ve kök boğazı çürüklüğünde (=fusarium crown and root rot) fungusun

gelişebildiği toprak sıcaklıkları 10-20°C arasındadır. Düşük toprak pH'sı, amonyum nitrat ve nemli topraklar hastalığın şiddetini arttırmaktadır (Roberts et al., 2000). Son yıllarda Fransa'da ve diğer bazı ülkelerde, sıcaklığın 26°C'nin üzerinde olduğu yaz aylarında da birçok işletmede bu hastalıkla karşılaşmıştır (Blancard, 2005).

FORL'nin toprak içindeki hareketi < 2,5 cm'dir. Patojenin bir bitkiden diğerine yayılması kökler tarafından olmaktadır. Ayrıca bulaşık bitkilerden ve klamidosporelerin toprak içindeki parçaların makine, ayakkabı, şaşıma kapları ve diğer malzemelere bulaşması yolu ile FORL yayılmaktadır.

Sterilizasyon yapılan toprakta patojen hızla yayılım gösterdiği için, hastalıkla mücadele zor olmaktadır. Mücadele de öncelikle hastalıktan arı temiz fidelerin kullanılması, kültürel işlemlere dikkat edilmesi gerekmektedir. Yetiştiricilik yapılacak alanlarda toprak fumigantları ile ilaçlama yapılarak hastalıkla mücadelede edilmektedir. Ancak pestisid kullanımının özellikle toprak kökenli patojenle uygulanmasında karşılaşılan teknik, çevresel ve ekonomik zorluklar nedeniyle istenilen hastalık kontrolü sağlanamamaktadır. Bunun yanında Doğu Akdeniz Bölgesinde bulunan seralarda uygun gelişme koşulları bulunan *fusarium oxysporum*'un hava kökenli sporlarının sera toprağında yeniden kolonize olması kimyasalların kullanımındaki başarıyı azalttığı bilinmektedir (Yücel, 1989). Mücadelede biyolojik ajanların kullanımı diğer bir mücadele yöntemidir ancak dayanıklı çeşitlerin kullanımı en ekonomik, çevreci ve sürdürülebilir yöntemdir.

Dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi uzun ıslah çalışmaları sonucu ortaya çıkmaktadır. Çünkü dayanıklılık kaynakları domatesin yabani türlerinde bulunmaktadır ve bir çeşide eklenen pek çok dayanıklılık genleri, ıslah çalışmalarında beraberinde istenmeyen özellikleri de getirmektedir (Scott, 2005).

Son yıllarda biyoteknoloji alanındaki hızlı gelişmeler, bitki ıslahında kullanımını rutin hale getirmiştir. Klasik ıslah çalışmalarında kullanılan morfolojik işaretleyiciler genotipleri birbirinden ayırmaya yardımcı olmakla birlikte fenotipik özelliklerdir ve çevre koşullarından etkilenebilmektedir. Bu karakterlerden herhangi birinin resesif (çekinik) olması durumunda homozigot dominant ve heterozigot bireyler tespit edilememektedir. Bundan dolayı özellikle hastalıklara dayanıklılık ıslahında moleküler işaretleyicilerin kullanımı ile klasik bitki ıslahında büyük bir gelişme sağlanmıştır.

Dayanıklı genlerle bağlantılı moleküler işaretleyicilerin kullanılmasında ana avantaj, hassas ya da dayanıklı genotiplerin seçilebilmesidir. Genç bitki yapraklarından DNA hızla çıkarılır ve bulunan dayanıklı genler analiz edilir, yalnızca dayanıklı genotipler seçilerek melezlenir ve sonraki generasyonlarda yeni dayanıklı çeşitler elde edilir. Böylelikle seleksiyon için zaman ve yer azaltılarak bir günde yüzlerce bitki aynı anda seçilebilir (Barone et al., 2005).

İşaretleyici yardımcı seleksiyon (MAS), ıslah populasyonlarının, bitki gelişiminin erken aşamalarında azaltılmasına izin vermektedir. Böylelikle bitki ve hayvan ıslahındaki faydası artmaktadır. Geniş populasyonlar pek çok moleküler işaretleyiciler ile taranabilmektedir.

MAS metotlarının gelişmesiyle, minimum zaman ve para girdisiyle, maksimum bilgi elde edilmektedir (Frey et al., 2008). Böylelikle üstün genotiplerin bulunduğu bir populasyon elde edilmektedir (Dayteg et al., 2007). Bugün istenilen genotiplerin seçimi, DNA seviyesinde yapılabilmekte arazide ya da sera denemelerinde uzun yıllar süren aşamalara gerek kalmamaktadır. Pek çok moleküler işaretleyici kombine olarak kullanılabilen ve farklı genlerin aynı ıslah hattında toplanması sağlanabilmektedir (Hospital, 2003).

Islah programlarında pek çok birey ekonomik anlamda kısıtlama gerektirir, moleküler işaretleyicilerin kullanımı, teknik açıdan kullanımı kolay, ucuz ve bilgilendiricidir. Temelde, iki farklı DNA işaretleyici tekniği mevcuttur. Birincisi DNA hibridizasyonuna dayalı RFLP (restriction fragment length polymorphism), diğeri ise PCR (polymerase chain reaction)'ye dayalı SSR (simple sequence repeats), RAPD (random amplified polymorphic DNA), AFLP (amplified fragment length polymorphism) ve SRAP (sequence related amplified polymorphism) teknikleridir (Gülşen ve Mutlu, 2005; Hernandez, 2004). PCR basit ve hızlı bir metottur, yalnızca küçük bir ham ekstrakt DNA ister ve prosedür otomasyona bağlıdır.

Günümüzdeki ıslah programları ağırlıklı olarak dayanıklı çeşit geliştirmeye yönelik olmaktadır. Çünkü yetiştiricilikte önemli ekonomik kayıplara yol açan hastalıklarla en etkin mücadele yöntemi dayanıklı çeşitlerdir. *Fusarium oxysporum f.sp. radidis lycopersici*, verimde %20-60 oranında kayıplara neden olmaktadır (Omar et al., 2006). FORL ile ilgili genetik dayanıklılık tek (*Frl* geni) bir dominant gen tarafından kontrol edilmektedir (Roberts et al., 2000; Vakalounakis, 1988).

Dayanıklılık kaynağı, domatesin yabancı bir türü olan *Solanum peruvianum*'dur ve dayanıklılığı ifade eden gen *Frl* olarak sembolize edilmiştir (Laterrot and Moretti, 1991). *Frl* ile ilişkili işaretleyici belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışmalarda *Frl*'nin domatesin 9. kromozomunda yer aldığı ve tütün mozaik virüsüne dayanıklılığı kontrol eden genle (*Tm-2*) resesif *ah* genine yakın yerde (> 5 cM) lokalize olduğu belirlenmiştir (Fazio et al., 1999; Vakalounakis et al., 1997). Fazio et al., 1999'da yaptığı çalışmada *Frl* genine 5.1 cM uzaklıkta tespit edilen RAPD işaretleyicisi, gene uzak olduğu için ıslah çalışmalarında seleksiyonda kullanılamamıştır.

Bu noktadan hareketle bu çalışmada; *Frl* genine daha yakın olabilecek ve ıslahta işaretleyicilere dayalı seleksiyonda (MAS) kullanılacak moleküler işaretleyici(lerin) bulunması amaçlanmıştır.

Bu hastalığa karşı dayanıklı yerli domates çeşidi yok denecek kadar azdır. Araştırma sonucunda elde edilecek işaretleyicilerin yerli dayanıklı hibrit çeşit eldesini rutin hale getireceği, hız kazandıracağı ve dayanıklı yerli çeşitlerin pazar payını arttıracığı düşünülmektedir. Ayrıca moleküler işaretleyiciler yardımıyla hastalıklara dayanıklı domates anaçlarının geliştirilmesi de mümkün olabilecektir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. *Fusarium oxysporum* İle İlgili Çalışmalar

Toprak kökenli bitki patojenlerin çoğu, önemli bahçe ve tarla kültürlerinde çökerten, fide yanıklığı, kök ve kök boğazı çürüklüğü, kök kahverengileşmesi ve solgunluğu gibi ekonomik bakımdan önemli kök hastalıklarında esas rolü oynarlar (Yücel, 1989).

Fusarium'un 20'nin üstünde türü vardır. En çok görülenleri, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* ve *Fusarium chlamydosporum*'dur. *F.avenaceum*, *F.culmorum*, *F. moniliforme*, *F. equiseti* gibi bazı *fusarium* türleri bitki türü ayırt etmeksizin bulaştırma yaparken, bazıları cinse, türe hatta çeşide özgüdür. Örneğin, *F. coeruleum*, *F. eumartii* ve *F. sambucinum* patatese, *F. buharicum* pamuğa, *F. xyllarioides* kahve'ye özgüdür.

Türkiye'de *Fusarium* türlerinin varlığı üzerine yapılan çalışmalarda 55 bitki türünde 31 *Fusarium* türü saptanmıştır. Domatesten izole edilen *fusarium* türlerinin ise bölgelere göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir. *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F.solani* Çukurova Bölgesinde; *F.solani* İzmir, Manisa, Aydın, Denizli, Muğla, Kütahya ve Balıkesir; *F. oxysporum*, Uşak ve Çanakkale; *F. equiseti* Ankara; *F.solani* Ege Bölgesinde; *F. oxysporum* ve *F. semitectum* Uşak, Çanakkale ve İzmir'de saptanmıştır (Özer ve Soran, 1991).

Fusarium oxysporum Solanaceae bitkilerinde farklı solgunluğa neden olmaktadır. Domateste *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* ve

radicis lycopersici, patlıcanda *fusarium oxysporum f. sp. melongenae*, biberde *fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum*'dur (Miller et al., 1996).

Fusarium oxysporum mikrokonidi, makrokonidi ve klamidospor olmak üzere üç tip spor üretmektedir. FORL'nin yayılmasında ve hayatta kalmasında bu spor tiplerinden ikisi göze çarpmaktadır. Mikrokonidi formu nekrotik dokuda büyük kalıntı içermekte ve sterilazyon yapılan sera topraklarında hava akımı ile yayılmaktadır. Klamidosporlar ise kalın duvarlara sahiptirler ve fungus toprakta uzun periyodlar boyunca hayatta kalabilmektedir (Ozbay ve Newman, 2004). *F. oxysporum* Patates Dekstroz Agar (PDA) gibi katı ortam kültürlerinde çoğaltılabilirler. Genel olarak, havai miselleri önce beyaz görünür, daha sonra *F. oxysporum*'un ırkına yada türüne göre mor'dan koyu pembeye değişen renge dönüşebilirler. Eğer sporlar çok yoğunsa kültür, krem ya da turuncu renge görünür (Gonsalves et al., 1993).

Fusarium oxysporum geniş bir konukçu aralığına sahiptir. Bu fungusun bazı form spesiesleri konukçuya özelleşmiştir. *Fusarium solgunluğu* etmeni *F. oxysporum f. sp. lycopersici* (Fol), kök ve kök boğazı çürüklüğü etmeni *F. oxysporum f. sp. radicis lycopersici* (Forl) olarak bilinmektedir (Armstrong, 1981; Farley et al., 1975). Bu iki patojen morfolojik olarak ayırt edilemez. Her ikisi de domateste konukçu olmalarına rağmen ayrı formda hastalıklarıdır (Attitalla et al., 2004).

Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici ilk olarak 1895 yılında tanımlanmış ve dünyanın 32 ülkesinde yayılım göstermiştir. Hastalığın 3 ırkı bildirilmiştir. Irk 1 en yaygın olup, coğrafi bölgelerin pek çoğunda rapor edilmiştir. Irk 2 ilk olarak 1940 yılında Ohio'da rapor edilmiş

ancak 1961 yılında Florida'da bulunana kadar çok yaygın olmamıştır. Avustralya, Meksika, İsrail, Fas, Hollanda ve Irak'ta görülmüştür. Irk 3 ise ilk olarak 1966 yılında Brezilya'da rapor edilmiş daha sonrasında Avustralya, Florida ve Kaliforniya'da bulunmuştur (Wong, 2003).

Fol için optimum toprak ve hava sıcaklığı 28°C'dir. Çok sıcak (34°C) ya da çok serin (17-20°C) toprak sıcaklıkları hastalığın gelişimini yavaşlatmaktadır. Hastalık hassas domates çeşitlerinin ksilem dokusuna yerleşmekte ve bitkinin su taşım sistemini etkilemektedir. Sonuçta yapraklarda ve bitkide sararma, solma ve ölümler olmaktadır (Katan et al., 1997; Wong, 2003).

Kök ve kök boğazı çürümelerine neden olan FORL ise; ilk olarak 1974 yılında Florida'da bulunmuştur. Hastalık özellikle Florida'nın güney bölgelerindeki asidik, kumlu topraklarda yetiştirilen domates alanlarında yaygın olarak tespit edilmiştir. Daha sonra Kanada, Meksika, İsrail, Japonya ve pek çok Avrupa ülkesinde bulunmuştur. Sera ve açık alanlarda önemli verim kayıplarına neden olan hastalık özellikle topraksız tarımın uygulandığı besin solüsyonunun re-sirküle edildiği NFT (Nutrient Film Technique), kaya yünü gibi ortamlarda büyük kayıplara neden olmaktadır. Verim kaybı % 15-65 arasında değişmektedir. Fungusun bitkiye girişi yara yüzeylerinden olmakta, simptomları fide aşamasında sararma, olgunlaşmamış kotiledonlar ve yaprak sayısında azalma iken yaşlı bitkilerde yavaş sararma, hasat sonuna kadar yaşayabilme şeklinde görülmektedir. Hastalığın gelişebildiği optimum sıcaklık 21°C'dir (Özbay ve Newman, 2004; Roberts et al., 2000; Rowe and Farley, 1977; Jarvis et al., 1981).

Fusarium oxysporum geniş bir fungal patojen olup, ekonomik olarak önemli 100'den fazla konukçusu bulunmaktadır. *F. oxysporum*'un genetik çeşitliliği Vejetatif Uyumluluk Grupları (Vegetative Compatibility Group; VCG) ile sınıflandırılmaktadır. Bir fungus türünün veya ırkının birbirine olan genetik yakınlığı bu şekilde araştırılabilmektedir. Bu yöntem ilk olarak 1980'li yılların ortalarında Puhalla tarafından geliştirilmiştir. Buna göre vejetatif uyumluluk izolatlarına 4-5 sayıdan oluşan VCG kodu verilmiş, ilk üç sayı konukçuya özelleşmiş, son sayıda form speciese ait olacak şekilde verilmiştir (Kistler et al., 1998).

Fusarium türlerin tanılanmasında ayrıca serolojik bir yöntem olan ELİSA testi ve DNA molekülleri arasındaki dizilim farklarının ortaya konduğu RFLP yöntemi de kullanılmaktadır (Summerel et al, 2001).

Örneğin nohutta sararma ve solgunluğa neden olan *F. oxysporum f.sp. ciceris*'in 8 ırkı için özellikli primerler geliştirilmiş ve bunların kullanılmasıyla çeşitli bölgelerden toplanan ırkların ayrımı yapılmıştır (Gasco and Diaez, 2003).

Attitalla et al., (2004), FOL ve FORL izolatlarının farklılıklarını saptamak için 3 teknikle çalışmıştır. İzozim DNA, mitokondrial DNA RFLP ve osmotik methodlar kullanılarak fungal pigmentler ortaya çıkarılmıştır. İzolatlar coğrafik olarak geniş bölgelerden toplanmış ve sonuçta mitokondrial DNA RFLP tekniği, FOL ve FORL izolatları arasındaki farklılığı belirlemede en etkili araç olduğu belirlenmiştir.

İngiltere, Hollanda, Fransa ve Belçika'dan elde edilen 37 FORL izolatı ile yapılan çalışmada 4 vejetatif uyumluluk grubu (VCG)

belirlenmiştir. Bunların üç tanesi (0090, 0091, 0094) önceden 0097 ise yeni tanımlanmıştır. VCG 0094 İngiltere, Hollanda ve Belçika'da dominant iken Fransa değildir. Ayrıca bu izolat üç alt gruba bölünmüştür. Yüksek seviyede genetik farklılık gösteren bu patojenin batı Avrupa'da birçok VCG ve alt grupları bulunmuştur (Katan and Katan, 1999).

İtalya'da 5 farklı bölgeden toplanan Forl izolatları ile 5 VCG grubunun oluşturulduğu çalışmada, 65 izolatın VCG 0090, 99 izolatın VCG 0091, 23 izolatın VCG 0092, 2 izolatın VCG 0093 ve 2 izolatın da VCG 0096 olduğu bildirilmiştir. Ayrıca İtalya'da ki Forl'un populasyon yapısının İsrail'de bildirilen ile benzer olduğu ortaya konmuştur (Primo et al, 2001).

Ülkemizde ise Adana- Mersin'de bulunan plastik tünellerden alınan domates örneklerinde Forl etmeni saptanmıştır. Bu izolatların VCG 0090 II ve VCG 0091 I olduğu belirlenmiştir. VCG 0090 II ve VCG 0091 I'e ait 11 izolat yerel domates çeşidine (Urfa) kök daldırma metoduna göre inoküle edilmiş ve $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ (12 saat foto periyot)'de büyümeye bırakılarak enfeksiyonlu bitkilerden re izolasyon yapılmıştır (Can vd., 2003).

F.oxysporum f. sp. radidis lycopersici tarafından sebep olan fusarium kök ve kök boğazı hastalığı Akdeniz Bölgesinde, Avrupa, Amerika ve Japonya'da bildirilmiş olup, ülkemizdeki ilk bildirimini Can vd., (2004) çalışmasıdır.

Hastalıkla mücadelede farklı yöntemlerin kullanıldığı pek çok çalışma yapılmıştır. Bu mücadele yöntemleri arasında hastalıktan arı fide

kullanımı, kültürel önlemler, kimyasal mücadele ve solarizasyon, biyolojik kontrol sistemi ve dayanıklı çeşit bulunmaktadır.

a) Hastalıktan ari fide kullanılması; yetiştiriciliğin ilk aşamasında dikkat edilmesi gereken önlemdir. Yetiştiricilik esnasında kültürel işlemlere dikkat edilmeli, hastalığın görüldüğü bitkiden diğerine geçiş engellenmelidir.

b) Kimyasal mücadele ve solarizasyon: Hastalıkla mücadele %100 etkili bir kimyasal olmamakla birlikte toprak solarizasyonunda metil bromit kullanımı iyi bir kontrol sağlamaktadır. Ancak bu kimyasalın ozon tabakasında yarattığı tahribat sonucu yasaklanması, steril toprakta fungusun yeniden bulaşma yapması ve kimyasalların tümörü teşvik etmesi, besin ve sudaki kalıntılarının insanda kansere neden olması bu mücadele şeklini etkisiz hale sokmaktadır (Omar et al., 2006). Solarizasyon ise yaz mevsimi sıcak geçen bölgelerde yapılabilen başarıyı ise toprak nemi, sıcaklığı, güneş ışığının şiddeti ve süresi gibi faktörler etkilemektedir (Yücel, 1989).

c) Biyolojik kontrol sistemi: Yapılan araştırmalar göstermektedir ki hastalıkla mücadele de biyolojik ajanların kullanımı da etkili bir yöntemdir. Trichoderma fungusu Forl ile mücadele de başarı sağlamıştır. Bu konu ile ilgili olarak pek çok araştırma yapılmış olup, Trichoderma harzianum kullanımının hastalığı % 12 oranında azalttığı bildirilmiştir (Datnoff and Pernezny, 2001).

d) Hastalıkla mücadelede %100 etkili yöntem dayanıklı çeşit kullanımıdır. Bu konu ile ilgili çalışmalara bakıldığında Japonya'da 'IRB-301-30' ve 'IRB-301-31' dayanıklı ıslah hatlarının gama ışınlanması

ile elde edildiği bildirilmektedir. ‘IRB-301-31’ sonraki ıslah çalışmalarında kullanılarak, pembe meyveli ‘Ohio CR6’ çeşidi geliştirilmiştir. Yapılan ıslah çalışmaları ile dayanıklılık yeni çeşitlere aktarılmıştır (Yamakawa and Nagata, 1975; Scott and Farley, 1981). Mücadele de ayrıca anaçların kullanımı da önemli bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Hibar et al., (2006) ‘Beaufort F₁’ ve ‘He-Man F₁’ anaçları ile yapmış oldukları denemede dayanıklı anaç kullanımının verim ve kaliteyi arttırdığını ayrıca hastalıkla mücadele de etkili olduğunu ortaya koymuşlardır.

2.2. Moleküler İşaretleyicilerin Kullanılması İle İlgili Çalışmalar

Çeşitlilik ve genetik ilişkileri belirlemede moleküler işaretleyicilerden faydalanılmaktadır. İşaretleyiciler; morfolojik, biyokimyasal ve moleküler olmak üzere 3 şekilde gruplanabilmektedir. Morfolojik işaretleyiciler, bitki populasyonu içinde, bir bitki ya da bir grubunu diğerlerinden ayıran seçici özellik, o genotipi ayıran bir işaretleyici olarak değerlendirilir. Biyokimyasal işaretleyiciler, tohum proteinleri, yapraklarda bulunan kimyasallar, sekonder metabolitler, izoenzimler, vs. bu gruba girerler. Ancak en yaygın kullanılan komponentler izoenzimler ve tohum proteinleridir.

Moleküler işaretleyiciler, son yıllarda sistematik çalışmalarında yaygın olarak kullanılmakta olup, çeşitli avantajlara sahiptir. Çevre faktörlerinden etkilenmezler, çekirdek ve farklı kalıtım şekline sahip kloroplast ve mitokondri gibi organel genomlar ayrı ayrı çalışılabilir, genetik değişiklikleri daha fazla yansıttıkları için daha az pleiotrofikdir

(bir genin birden fazla karakteri kontrol etmesi), her bir ebeveynden gelen farklı karakterler tespit edilebildiği için bitkilerin genetik orijini tespit edilebilir, sonsuz sayıda moleküler işaretleyici elde edilebilir (Gülşen ve Mutlu, 2005).

Moleküler işaretleyici teknolojisi hızla gelişmekte ve ticari ıslah programlarında 1990'lardan beri kullanılmaktadır. Islah çalışmalarında istenen genotipler seçilerek melezlenir, böylelikle seleksiyon için zaman ve yer azaltılarak bir günde yüzlerce bitki aynı anda seçilebilir (Barone et al., 2005; Young and Tanksley, 1989).

Klasik bitki ıslahı, üstün bireyler arasından fenotipik seleksiyon ile istenen bireylerin seçimine dayanmaktadır. Örneğin fasulyede tohum büyüklüğü ve tohum kabuğundaki pigmentasyon arasındaki ilişkiyi ıslahçılar uzun yıllar morfolojik karakterizasyonda kullanmışlardır. Fakat morfolojik karakterizasyonun genetik ve ıslah çalışmalarında kullanımı dominansi ya da epistatik interaksiyon, vb. durumlarda bazı zorlukları ortaya koymuştur (Foolad, 2007).

Islahçılar hastalıklara dayanıklı çeşit geliştirmede güvenilir ve hızlı moleküler işaretleyicileri kullanmaktadırlar. İşaretleyici kullanarak seleksiyon (MAS) ile dayanıklı genlerin transferi mümkün olmaktadır.

İşaretleyici yardımcı seleksiyon (MAS) bitki ıslahında maliyeti azaltmakta, seleksiyonun doğruluk ve verimliliğini arttırmaktadır. Ayrıca fide aşamasında seleksiyon sağlayarak ıslah programlarını hızlandırmaktadır. MAS gen piramidinde, geriye melezleme programlarında, resesif ve eklemeli gen transferlerinde de önemlidir. MAS ile yıl içinde çok yönlü ıslah programlarını yürütmek mümkündür.

İşaretleyici yardımcı seleksiyon (MAS) teknolojisi hastalıklara dayanıklılık için kullanımının yanında domateste olgunlaşma, karotenoid içeriği (Lycopene, beta karoten) vb. özellikler için de kullanılmaktadır (Williams et al., 1993; Foolad, 2007).

Genel olarak iki tip moleküler işaretleyici bulunmaktadır. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism=Kesilmiş parça uzunlukları farklılığı), tipi moleküler işaretleyiciler DNA-DNA hibridizasyonuyla gerçekleştirilmektedir ve genellikle radyoaktif maddelerle tespit edilmektedir. Diğer sınıf işaretleyiciler ise SSR, ISSR, RAPD, AFLP ve SRAP gibi PCR'a dayalı işaretleyicilerdir (Gülşen ve Mutlu, 2005).

PCR'a dayalı işaretleyicilerin kullanımı, kullanıcı için kolay, ucuz, hızlı, ve daha az yoğunlukta işgücü gerektirmesinden dolayı hızla artmıştır.

Bu çalışmada SRAP, SSR, RGA ve Cos II işaretleyicileri ile değişik kombinasyonlar kullanılmıştır. Bundan sonraki bölümlerde bu işaretleyicilerin kullanımı ile ilgili çalışmalar yer almaktadır.

2.2.1. Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP) ile İlgili Çalışmalar

SRAP, Li and Quiros, (2001) tarafından geliştirilmiş, basit, güvenilir, yeterli oranda ve kolay elde edilir bandlar veren PCR'a dayalı işaretleyici sistemidir. 17 ve 18 bp uzunluğunda ileri (forward) ve geri (reverse) primerlerinden meydana gelmektedir. Forward primerleri 13 yada 14 bp uzunluğundaki bir ana dizilimden meydana gelmektedir ve

CCGG dizilimi tarafından takip edilmektedir. 3' ucunda 3 adet seçici (ayıran) nükleotid içermektedir. Reverse primerleri de forward primerleri gibi benzer bileşimden meydana gelmekte, CCGG dizilimi yerine AATT dizilimini içermektedir. AATT dizilimini de primerin sonunda 3' ucunda eklemeli üç seçici nükleotid takip etmektedir.

SRAP işaretleyicileri, RAPD işaretleyicilerine göre daha yüksek oranda tutarlı sonuçlar ortaya koymaktadır. AFLP işaretleyicilerine göre daha ucuz ve daha az işçilik gerektirmektedir (Li and Quiros 2001).

SRAP işaretleyicileri bir çok türde genetik çeşitlilik çalışmalarında başarıyla kullanılmıştır.

Li and Quiros, (2001) *Brassica oleracea* L.'nin rekombinant ıslah hatları ve double-haploid hatlarında çalışmışlar ve jelden izole edilen bantların %45'i dizilim analizinden sonra Gen bankasındaki bilinen genler ile eşleştiğini bildirmişlerdir. Dizilim analizinden sonra SRAP işaretleyicilerinin %20'sinin ko-dominant işaretleyici olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada SRAP ile *Brassica*'da bulunan glucosinolate desaturation genini (BoGLS-ALK) işaretlediklerini belirtmişlerdir.

Budak et al., (2004) SRAP primerlerini kullanarak çeşitli koleksiyondaki 53 çim (buffalograss) genotipinin genetik çeşitliliğini değerlendirmiştir. 34 SRAP primer kombinasyonunun kullanıldığı çalışmada genotipler arasındaki genetik uzaklığın 0.33'den 0.99'a kadar değişim gösterdiğini belirlemişlerdir. SRAP gibi PCR'a dayalı teknolojilerin kullanımının genetik çeşitliliğin ölçülmesinde etkili bir araç olduğunu bildirmişlerdir.

Suman et al., (2008) 30 şeker kamışı genotipini, 31 SRAP primer kombinasyonu ile taramışlar ve 1364 fragmentin 1135 (%83)'ini polimorfik bulmuşlardır. Primer kombinasyonlarından ortalama 44 parçacık elde edilmiş ve 119 (%8.7)'unun türe spesifik olduğu bildirilmiştir.

Li et al., (2007) turpta genetik çeşitlilik analizinin RAPD, AFLP ve SRAP işaretleyicilerini kullanarak yaptığı çalışmada, 11'i çin varyetesi, 5 yabancı kültür varyetesi ve 1 yabancı olmak üzere toplam 17 varyete kullanmışlardır. RAPD işaretleyicisi %93,4'lük bir oranla en fazla polimorfizmi vermiş, ayrıca RAPD ve SRAP'a dayalı dendogram verileri ile morfolojik özelliklere göre sınıflandırma arasında uyum olduğunu bildirmişlerdir.

Smutkupt et al., (2006) 22 baklagilde DNA parmak izini belirlemek ve her çeşit için spesifik işaretleyici sağlamak için SRAP işaretleyicilerini kullandıkları çalışmada, 84 SRAP primer çifti ile taranmış, 8 primer çifti en iyi sonucu vermiştir. 393 DNA fragmenti %96.95 ile polimorfizm verdiğini bildirmişlerdir.

Gülşen vd., (2007) SRAP ve fenotipik işaretleyicilerin kullanıldığı ve 23 bamya genotipinin arasındaki çeşitlilik ve ilişkiye bakılan çalışmada, 39 kombinasyonlu ileri ve ters (forward ve reverse) SRAP primerleri kullanılmıştır. 21 Türk ve 2 USA bamya genotipi 97 skorlanan işaretleyicinin %50'sinde polimorfizm bulunmuştur. 23 genotipin 17'si (%74) 0.93 benzerlik ile birbirinden ayırt edilmiştir. Arazide 33 kalıtsal özellik ölçülmüş ve 28'i (%85) polimorfik bulunmuştur. 33 fenotipik işaretleyiciye dayalı UPGMA dendogramı tüm genotipleri ayırt etmiştir.

Fakat bamyaya genotiplerinin coğrafi ilişkisi belirlenememiştir. Bu çalışmada SRAP işaretleyicilerinin, bamyaya genotiplerinde çeşitlilik çalışmalarında kullanılabileceği ortaya konulmuştur.

Anna and Mark, (2005), SRAP, AFLP ve SSR tekniklerinin karşılaştırıldığı çalışmada 24 elit brokoli hat grubunun farklılığını araştırmıştır. Genomik DNA, 24 AFLP, 24 SRAP ve 44 SSR primer çifti kullanılarak denenmiştir. Bu değerlendirmede SSR primer başına ortalama 2 parçacık vermiş, AFLP metodu SSR'dan daha az oranda polimorfizm (%63) göstermesine rağmen, primer başına 20 parçacık üretmiştir. SRAP primer başına ortalama 14 bant üretmiş ve bunların da % 82'si polimorfik bulunmuştur. Bu çalışma ile AFLP ve SRAP primerlerinin elit brokoli hatlarında farklılık çalışmalarında daha etkin olduğu ortaya konulmuştur.

Hiyarda yüksek sıcaklıklara dayanıklılıkta QTL analizi ve genetik haritalama için SRAP işaretleyicisinin kullanıldığı çalışmada, her bir ileri (forward) primeri farklı geri (reverse) primerleri ile kombinasyon yapılmış ve polimorfizm oranı 5'ten 8'e çıkarılmıştır. Aynı şekilde geri (reverse) primerleri de, farklı ileri (forward) primerleri ile kombinasyon yapıldığında polimorfik primer oranının 2'den 11'e arttığı belirlenmiştir. Geri (Reverse) primerleri SA4 yada EM6 bütün ileri primerleri ile test edildiğinde tanımlanan polimorfik bantlar vermiştir (Qian et al., 2006)

SRAP işaretleyicileri akrabalık ilişkileri belirlemenin yanı sıra dayanıklılık, kalite gibi pek çok özellikle ilişkili haritaların oluşturulmasında da yaygın kullanılan bir yöntem olmuştur.

Yeboah et al., (2007) hıyarda SRAP ve ISSR işaretleyicilerine dayalı genetik haritalama yaptıkları çalışmada, 'PW0832' ve 'PW0801' hıyar hatlarını melezlemişler ve 112 F₂ bitkisini kullanmışlardır. 50 ISSR primeri ve 132 SRAP primer kombinasyonlarından 13 (%26) ISSR primerleri ve 26 (%20) SRAP primer çiftleri polimorfik bulunmuştur. Toplam 109 polimorfik işaretleyicilerin 48'i ISSR ve 61'i SRAP'tir. Ortalama polimorfik bantlar, ISSR'da 4, SRAP'te 2'dir. Bu çalışma ile hıyar, 7 bağlantılı gruba ayrılmıştır ve bulunan işaretleyiciler, işaretleyici yardımcı seleksiyon çalışmalarında kullanılabilir olarak bildirilmiştir.

Junson et al., (2005) S06 ve S52 hıyar ıslah hatlarını kullanarak F₂ popülasyonu oluşturdukları çalışmada, 64 SRAP primer kombinasyonu 108 polimorfik bant elde etmişlerdir. Mapmaker3.0 kullanılarak, bağlantı grubu yapılmış ve 77 SRAP işaretleyicisi 9 ilişkili gruba ayrılmıştır. İlk çiçek boğum özelliği ile ifade edilen *Ffn* geni 9. İlişki grubunda haritalanmış ve 10.3 cM and 12.1 cM mesafesinde bulunmuştur.

Ferriol et al., (2004) 47 kabakta morfolojik karakterizasyon sonucunda farklılık elde etmişler, moleküler analizde 5 ileri (me1-2-6-7-8) ve 4 geri (em1-2-5-6) ile 11 SRAP primer kombinasyonunda toplam 148 fragment elde etmişler ve bunların 98'ini (%66.2) polimorfik bulmuşlardır.

Levi and Thomas, (2007) 24 karpuz çeşidinde 146 işaretleyici (RAPD, ISSR, AFLP ve SRAP) kullanılarak yaptıkları haritalama çalışmasında farklı linkage grupları tespit etmiştir. 53 RAPD'in 5'i (%9.4), 15 ISSR'in 6'sı (%40.0), 37 AFLP'nin 30'u (%81.0) ve 41

SRAP işaretleyicinin 33'ü (%80.5) polimorfizm göstermiş ve SRAP işaretleyicilerinin polimorfizmde en etkili olduğu ortaya konulmuştur.

Yang et al., (2006) SRAP ve SSR işaretleyicilerini Brassica'da karşılaştırdığı çalışmada SRAP işaretleyicilerinde her primer kombinasyonu ortalama 20.36 band vermiş ve 4.44 polimorfik bant elde edilmiştir. SSR'da ise 3.88 ortalama bandın hepsi polimorfik bulunmuştur.

Han et al., (2007) Çin lahanalarının genetik çeşitlilik ve farklılığını SRAP işaretleyicilerini kullanarak yaptıkları çalışmada, 215 lokus 21 çift SRAP primerleri ile taranmışlardır. Genetik varyasyonun ölçümü, genetik farklılığın katsayısını % 58.22 bulmuştur.

Wu et al., (2003) SRAP ile pamukta genetik bağlantı haritasını oluşturma çalışmalarında, 'Handan208' ve 'Pima90' hatlarının melezlenmesi ile 129 F₂ bireyi elde edilmiştir. İki ebeveyn arasındaki polimorfizmi bulmak için 136 primer çifti F₂ popülasyonunda kullanılmış, me3 ve em2 kombinasyonlarında en fazla polimorfik bant elde edilmiştir. MAPMAKER/EXP3.0 programı kullanılmış ve 39 bağlantı grupları üzerinden 237 lokus haritalanmıştır. Bu SRAP işaretleyicileri ile pamukta ilk bağlantı haritalaması olmuştur.

Juan et al., (2001) kerevizde resesif ve tek genle kontrol edilen CeMV virüsü ile ilişkili markör çalışmalarında, F₂ ve BC1 popülasyonları kullanılarak tarama yapmışlardır. Me1em2 işaretleyicileri dominant ve ikinci işaretleyici me8em2 resesif olarak ilişkilendirilmiştir. Açılım popülasyonunda her iki işaretleyici kullanılarak tarama yapılmış ve hastalığa dayanıklı homozigot ve heterozigot genotipler belirlenmiş,

böylelikle hastalığa dayanıklılık için fide aşamasında seleksiyon kullanılabilceği bildirilmiştir.

Rahman et al., (2007) tohum kabuğu rengi için Brassica türünde yaptıkları çalışmada, Span çeşiti (kahverengi tohumu) ve Bari-6 (Sarı) melezlenerek F₁, F₂, F₃ ve BC1 elde edilmiştir. Sarı hat ana ebeveyn gibi kullanıldığında polen etkisi bulunmuştur. Tohum kabuğu rengi, kahverengi, sarı-kahverengi ve parlak sarı şeklinde açılım göstermiş ve SRAP işaretleyicisi ana tohum kabuk rengi Br1/br1 ile bağlantılı bulunmuştur. Bu işaretleyici ıslah çalışmalarında seleksiyonda kullanmak için SNP ve SCAR işaretleyicisine çevrilmiştir.

Yuanyuan et al., (2007) Brassica napus'un (şalgam) genetik bağlantısı için 142 SRAP, 163 fonksiyonel işaretleyici, 160 SSR ve 117 AFLP işaretleyicisi, SI-1300 ve Eagle melezlenmesi ile elde edilen F₂ popülasyonundaki 184 birey kullanılmıştır. Bu harita 3.53 cM ortalama işaretleyici aralığı ile 2054,51 cM'i kapsamaktadır.

SRAP işaretleyicileri kullanılarak Pamukta yapılan çalışmada, 129 F₂ bitkisini 'Handan208' x 'Pima90' melezinden elde etmişlerdir. Toplam 136 primer çifti kullanılmış ve iki ebeveyn arasında 76 primer çiftinde en iyi polimorfizm ortaya konulmuştur. Çalışmada en fazla me3-em2 kombinasyonunda polimorfik bant elde edilmiştir (Maoging et al., 2003).

2.2.2. Simple Sequence Repeat (SSR) ile İlgili Çalışmalar

Simple sequence Repeats (SSR) çok sayıda art arda tekrarlanan, genetik işaretleyicilerin lokusa özel bilgi formundaki 2- 5 nükleotidden meydana gelmektedir. Yüksek organizmalarda henüz görevleri bilinmeyen, ancak düzenleyici rollere sahip olduğu düşünülen, rasgele tekrarlanan DNA bölgeleri vardır. Bu tekrarların her ünitesindeki nükleotid sayısına göre, **mikrosatellit** ve **minisatellit** olarak adlandırılır. Mikrosatellitler içerisinde en yaygın dinükleotid (örneğin ATATAT) tekrarlar olmakla birlikte, 1-6 bp'lik tekrarlar da bulunabilmektedir (Gülşen ve Mutlu, 2005).

Mikrosatellitler, aynı zamanda STR (short tandem repeats) veya SSR (simple sequence repeats) olarak da anılır ve 11-60 bp uzunluğundaki tekrarlardan oluşan minisatellitlerden (VNTR) farklıdır. Minisatellitler genellikle kromozomların uç kısımlarında, yani telomere yakın bölgelerde bulunmasına karşın, mikrosatellitler yüksek organizma (*Eucaryote*)'lara ait kromozomlar üzerinde daha bol ve gelişigüzel bir dağılım gösterir. Bu nedenle, bu tür tekrarlara dayalı bilgiler bütün genomu daha doğru temsil etmektedir. SSR ökaryotik genomlara doğru yayılırlar. PCR tekniği kullanılarak analiz edilebilirler. SSR genetik haritalama çalışmalarında genetik çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Ve pek çok bitki türünde örneğin, Arabidopsis, mısır, pirinç ve soya türlerinde kullanılır (Gülşen ve Mutlu, 2005; Poleg et al., 2001; Rafalski and Tingey, 1993).

Rajput et al., (2006) yaptıkları çalışmada 60 RAPD primerinin taramasını içeren bir ağ sistemi oluşturulmuştur. Tekrar elde

edilebilirliğini onaylamak için her deneme 50 defa 10 aday tarafından yapılmış, RAPD ve SSR teknikleri çalışılmıştır. Her teknik için laboratuarda farklı adaylara dağıtılmış ve elde edilen sonuçlar orijinal gönderici sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda RAPD'lerin yeniden elde edilebilirliğinin zor olduğu ortaya çıkarken, SSR allelleri bütün adaylar tarafından çoğaltılmış ve sadece küçük farklılıklar elde edilmiştir.

He et al., (2003) çok sayıda SSR işaretleyicisini geliştirmek ve karakterize etmek için yaptıkları çalışmada, 158 çift SSR primeri 19 farklı domates set çeşidinde taranmışlardır. 129 çift DNA fragmenti elde edilmiş ve 65'i polimorfik bulunmuş ve 19 set domates çeşidi polimorfik bulunan SSR lokuslarına göre sınıflandırılmıştır.

Tam et al., (2005) Domates ve biberde genetik çeşitlilik için SSAP, AFLP ve SSR işaretleyicilerini kullanmışlardır. Bu üç işaretleyici sisteminin karşılaştırıldığı çalışmada SSAP (sequence-specific amplification polymorphism) en bilgilendirici işaretleyici olarak bulunmuştur. Domates için SSAP, genetik varyasyon ve ilişkileri ayrıntılı bir şekilde gösterirken, SSR'ın spesifik genetik ilişki belirlemeye sahip olduğu bildirilmiştir.

Areshchenkova and Ganai, (1999) domateste bildirilen GATA motifini içeren tetranükleotid mikrosatellitlerin uzun dizilimi, bütün kromozomların sentromerleri etrafında toplanmıştır. Bu çalışmada domates mikrosatellitleri GA, GT, AT dinükleotid motifleri GATA gibi değerlendirilmiş ve *Lycopersicum esculentum* varyeteleri içinde

değişkenlikleri haritalanmıştır. GATA mikrosatellitlerinin domatesin sentromer bölgesinde yüksek oranda kümelendiği bildirilmiştir.

Martinez et al., (2006) çalışmalarında 19 SSR işaretleyicisi ve 7 AFLP primer kombinasyonu, güney-doğu İspanya'nın yerel 48 domates çeşidini karakterize etmek için kullanılmışlar ve yerel kültür domatesinin tanımlanmasında SSR ve AFLP işaretleyicilerinin faydalı olduğunu bildirmişlerdir.

Xia Ma et al., (2008) pamukta 'Jianglingzhongmian' × 'Zhejiangxiaoshanlüshu' melezlenmesinden elde edilen 189 F₂ bitkilerini kullanarak yaptıkları çalışmada, 6092 çift SSR primerleri ile iki ebeveyn arasında polimorfizm bulunmuştur. F₂ popülasyonunda 268 çift SSR primerleri ile daha iyi polimorfizm elde edilmiştir. Toplam 320 polimorfik band üretilmiş ve JoinMap3.0 ile bağlantı haritası oluşturulmuştur. Üç fenotipik özellik ile 267 lokus, 13 bağlantı grubu üzerinden haritalanmıştır. Haritanın toplam uzunluğu 2508.71 cM ve ortalama bitişik işaretleyiciler arası mesafe 9.40 cM bulunmuştur.

Zhang et al., (2007) çalışmalarında iki elit buğday varyeteleri 'Huapei 3' ve 'Yumai 57' melezlenmesinden elde edilen 168 hat ile yeni genetik bağlantı haritası bildirilmiştir. Harita da 305 lokus, 283 SSR ve 22 EST-SSR işaretleyicisi ile ifade edilmiş, ortalama bitişik işaretleyiciler arası mesafe 7.02 cM ve toplam harita uzunluğu 2141,7 cM bulunmuştur. 22 yeni SSR işaretleyicisinin kromozomal lokasyonları ve harita durumları belirlenmiş ve 14 bağlantılı grup bulunmuştur.

Eluch et al., (2008) arpada genetik çeşitliliğin araştırıldığı çalışmada, 48 arpa gentipi 22 SSR işaretleyicisi ile analiz edilmiş ve 4 işaretleyicinin tüm arpa genotiplerinde ayırım yaptığını bildirmişlerdir.

Meyvelerde de SSR tekniklerinden faydalanılmaktadır. Hong-Li et al., (2008) şeftalide genetik çeşitlilik için 51 çeşitle SSR kullanarak, 22 polimorfik SSR primer çifti seçmiş ve 51 şeftali çeşidinde toplam 111 allel bildirmişlerdir.

Zhu et al., (2006) 241 F₂ bitkisinde domates mildiyösü (*Phytophthora infestans*) SSR işaretleyicisi ile taradıkları çalışmada, hastalığa dayanıklılığı ifade eden *Ph-ROL* geninin 9. kromozomda olup, SSR işaretleyicisi TOM236'a genetik uzaklığının 5.7 cM olduğunu bildirmişlerdir.

Katzir et al., (1996) 8 kavun, 11 hıyar, 5 kabak, 1 balkabağı ve 3 karpuzda SSR işaretleyicilerini kullanmışlar ve toplam 7 SSR'in 5 tanesinin, kavun genotiplerinde polimorfizm gösterdiğini, 7 SSR'in 4 tanesinin de hıyar genotiplerinde 18–0.64 arasında bir genetik uzaklık gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

Danin-Poleg et al., (2000) kabakgil türlerinden geliştirilen 61 tane SSR işaretleyicisinin 40 tanesiyle, 13 adet kavun ve 11 adet hıyar çeşitleri arasındaki uzunluk farklılıklarını araştırmışlardır. Bu SSR'lar, egzotik ve tatlı kavun grupları arasındaki farkı belirlemiş ve ayrıca hıyarda iki alt tür olan *C. sativus* var. *sativus* ve *C. sativus* var. *hardwickii* birbirlerinden ayırabildiğini bildirmişlerdir.

2.2.3. Resistance Gene Analogue (RGA) ile İlgili Çalışmalar

Geçmişteki 10 yıl içinde pek çok R geni (Dayanıklılık Genleri) tanımlanmış, klonlanmış, sequencelenmiş ve farklı bitkilerde örneğin arabidopsis, domates, marul, patates, keten ve tütünde karakterize edilmiştir. R genleri geniş spektrumlu patojenlerin, virüs, bakteri ve funguslara dayanıklılığını ifade etmektedir. Ve R genleri amino asit seviyesinde dizilim motiflerini paylaşmaktadır. PCR teknolojisi kullanılarak, dizilim homologları arasında hastalıklara dayanıklı genler, tanımlanır, klonlanır. Pek çok tanımlanan RGA bilinen R genlerinin durumlarına göre soya, Arabidopsis, pirinç, arpa, buğday, patates ve mısırdaki haritalanmıştır. Arabidopsiste 2 RGA, fonksiyonel bir R geninden yada R gene ailesinden türetilmiştir (Zhang, 2002).

Arpada yapılan çalışmada, 3 arpa double haploid haritalama populasyonları kullanılarak, 1H- 7H kromozomların genetik olarak haritalanmasında toplam 13 tek RGA kullanılmışlardır (Steptoex Morex, Harringtonx TR306, LUGCx Bowman) (Mamadov et al., 2006).

Guo et al., (2006) buğdayda kök ve kök boğazı fungal patojenine (*Fusarium head blight* (FHB)) karşı yaptıkları çalışmada, RGA'ları kullanmışlardır. 18 RGA primer çifti ebeveynler ve bulklar arasında taranmış ve 7 primer kombinasyonu 22 net polimorfik bant üretmiştir. Bu kombinasyonlar populasyonda analiz edilmiş ve 5 RGA işaretleyicisi FHB ile bağlantılı bulunmuştur.

Zhang et al., (2007) yaptığı çalışmada, 22 AFLP- RGA primer kombinasyonu ile toplam 446 AFLP- RGA amplifike olmuş, dört pamuk genotipi arasında 76 (%17.0) ve 37 (%8.3) polimorfizm bulmuştur.

Dondini et al., (2004) armut ve kayısıda AFLP- RGA teknikleri ateş yanıklığı ve Sharka'ya dayanıklılık için kullanmışlar ve bazı RGA işaretleyicilerini kayısı ve armutta Sharka ve ateş yanıklığına dayanıklılık ile ilişkili bulmuşlardır.

Colins et al., (2001) 17 lokuslu arpa genomunu haritalamak için, 12 RGA sınıfı kullanmışlardır. RGA lokusu ile arpada kahverengi pas hastalığına dayanıklı *Rph4*, *Rph7* ve *Rph10* tanımlanmıştır.

Önal, (2006) patojensiz ortamda yetiştirilmiş uzun yumak otu ve bermuda çimi kök ve yeşil aksam cDNA örneklerinden R geni analogları (RGA'lar) izole etmek amacıyla, toplam 35 klonun DNA dizilemesini yapmış ve bunlardan 4 tanesinin bilinen R genlerine ve RGA'larla homolog olduğunu tespit etmiştir. Bulunan RGA'nın DNA dizisinden öngörülen aminoasit dizisinin 27 R proteinin dizileriyle karşılaştırılmaları sonucu bu RGA'ya en çok yakınlık gösteren beş proteinin arpadan MLA13, çeltikten Pi-ta, pattesten GPA2, Arabidopsis'ten RPP13 ve domatesten SW5 proteinleri olduğunu saptamışlardır.

Hori et al., (2006) *Fusarium* baş küfüne dayanıklılık için 2 arpa hattı ile melezleme ile yapılan çalışmada 'Harbin 2' (dayanıklı) ve 'Turkey 6' (hassas) hatları kullanılmıştır. Araştırmada 328 AFLP, 45 SSR, 1 RFLP-STs, 1 AFLP-STs, 4 resistance gene analog (RGA) ve 4 morfolojik işaretleyici yer almıştır.

Kanazin et al., (1996) tütünde (N), arabidopsis (RPS2) ve ketende (L6) dayanıklılık genlerini kodlayan bölgelerden dizayn etmişler ve soyada kullanmışlardır. Amplifikasyon ürünleri ile 9 RGA sınıfı belirlenmiş ve bu sınıfların genetik haritalaması 8 farklı bağlantı grubu ortaya koymuştur.

Hemming et al., (2004) domateste *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*'ye dayanıklılığı ifade eden *I-3* genini haritaladıkları çalışmalarında, RFLP, Cos, bilinen genler ve RGA'ları kullanmışlardır. Domateste 7. kromozomun uzun kolunda yer alan *I-3* geni, 0.3 cM bölge kapsayan RAF işaretleyicisi, e06 ve RGA 332 ile lokalize olduğunu bildirmişlerdir.

Huang et al., (2005) genomik bilgiyi kullanarak lokal bir RGA model adapte etmişlerdir. Domates bitkisinden domates mildiyösüne dayanıklılık ifade eden ve 11. kromozom üzerinde yer alan R3a izole edilmiştir. R3 kompleks lokusunun karşılaştırmalı analizlerde eski lokus olduğu ve bitkide fungal patojenlere karşı kalıtsal bağışıklık içerdiği ileri sürülmüştür.

2.2.4. Conserved Ortholog Set II (Cos II) ile İlgili Çalışmalar

Cos işaretleyicileri, asterid türlere ait korunmuş, tek kopya ortholog genlerden PCR yoluyla geliştirilmişlerdir. Her bir Cos II geni yalnızca bir tek kopya Arabidopsis geni ile eşleşmektedir. Cos işaretleyicileri ile CosII işaretleyicilerinin karşılaştırılmasına baktığımızda;

1- Arabidopsis'te olduğu gibi domates, patates, biber ve kahvede geliştirilen EST (expressed sequence tag) bağlantılı unigen veri bankasının geliştirilmesi COS II'lerin daha kolay testleme imkanını sağlaması ile hızlanmıştır,

2- Filogenetik analizleri destekleyerek sınıflandırma işlemlerini hızlandırması,

3-Ortak tek kopya gen setlerinin farklı türlerin tanımlanmasını kolaylaştırması,

4- Benzer ekzon/intron dizi gruplarına sahip olan ortholog gen kopyaların çoğaltımına olanak vermesiyle, üzerinde çalışılan türler için universal primerlerin geliştirilmesine büyük katkı sağlaması,

5- Solanaceae familyasına üye türler ile Arabidopsis arasında universal primerlere göre daha güçlü bir synteny kurulmasını sağlaması olarak karşımıza çıkmaktadır (www.sgn.cornell.edu).

Şu ana kadar domateste 300'den fazla Cos II işaretleyicisi haritalanmış ve gelecekte 500'ün üzerinde haritalanabileceği belirtilmektedir. Bu Cos II işaretleyicileri Solanace türlerinde (örneğin; patlıcan, biber, tütün vb.) haritalanabilir. Cos II işaretleyicilerinin pek çok avantajları bulunmaktadır.

AFLP, RFLP ve SSR işaretleyicileriyle tanımlanamayan bölgeler COS II işaretleyicileri kullanılarak çok daha hızlı bir şekilde haritalanabilmektedir. COS II işaretleyicileriyle yapılan haritalama işlemi AFLP, SSR ve RFLP teknikleri ile karşılaştırıldığı zaman daha zahmetsiz ve ucuza mal olan bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır. Domates için başlangıçta geliştirilen bu işaretleyici setinin diğer Solanaceae familyası üyeleri ve aralarında ortholoji bulunan diğer

türlerdeki bitki gruplarına uygulanabilir olması sonucunda bugün türler arası akrabalık ilişkilerinin çözümünde COS II işaretleyicileri büyük bir kolaylık sağlamıştır. Transgenik bitki üretimi ve ıslaha yönelik çalışmalar açısından COS II işaretleyicileri kullanımıyla ilgilenilen gen ya da gen gruplarının belirlenerek klonlanması daha kısa bir sürede gerçekleştirilmektedir (www.sgn.cornell.edu).

Fulton et al., (2002) geniş domates EST verilerini Arabidopsis genomik dizilime karşı taramışlar ve 1025 gen tanımlamışlardır. Bu genlerin her iki genomunda tek bir kopyası olduğunu bildirmişlerdir. Bu gen seti, domates ve arabidopsis gibi farklı genomlar arasında kıyaslamalı haritalama çalışmalarında kullanılabilir. Bu Cos işaretleyici seti, kıyaslamalı genomlarda, filogenetiklerde ve bitki evrimi boyunca doğal genlerin korunmasını açıklama çalışmalarında tanımlanır. 27.000 domates unigenleri %55'i Arabidopsis genomu ile eşleşmektedir.

2.3. Domateste Dayanıklılık Çalışmalarında Moleküler İşaretleyicilerinin Kullanılması

Domatesin ilk klasik bağlantı (ilişki) haritası işaretleyicileri 12 göstermiş ve 1968 yılında bildirildiğinde 153 morfolojik ve fizyolojik işaretleyiciyi içermiştir. Yıllar içerisinde harita genişlemiş, 258 morfolojik ve fizyolojik işaretleyiciyi geliştirilmiştir. Domateste 1300'ün üzerinde morfolojik, fizyolojik ve hastalıklara dayanıklılık genleri bulunmakta ve bugün bunun yaklaşık 400'ü haritalanmış durumdadır (Foolad, 2007).

Sandbrink et al., (1995) *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*'in neden olduğu domates bakteriyel solgunluk ve kanser hastalığına dayanıklı *L. peruvianum* LA 2157 ve hassas *L. peruvianum* LA 2172'den geriye melez popülasyonu oluşturmuşlar ve hastalığı içeren lokusu haritalamak için RFLP işaretleyicilerini kullanmışlardır. 1, 6, 7, 8 ve 10. kromozomlar üzerinde 5 bölgenin dayanıklılığı içerdiğini bildirmişlerdir.

Coaker and Francis, (2004) *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*'a dayanıklılığı kontrol eden Rcm 2.0 ve Rcm 5.1 iki QTL lokusunu haritalamışlardır. Rcm 2.0 14.9 cM aralıkla 2. kromozomun üzerinde, Rcm 5.1 ise 4.3 cM aralıkla 5. kromozomun üzerinde haritalanmıştır. 750 F₂ bitkisinden elde edilen açılımla çalışılmış ve dayanıklılığın eklemeli gen ve eklemeli epistatik interaksiyon ile kontrol edildiğini bildirmişlerdir.

Stommel and Zhang, (2001) domateste Antraknoz dayanıklılığının kalıtımını ve QTL analiz ettiği çalışmada, hastalığa hassas 'US28' çeşidi ve 3 dayanıklı ıslah hattı arasında melezleme yaparak F₁, F₂ ve BC popülasyonu oluşturmuşlardır. Hastalığın skorlaması ebeveynlerde ve melezleme ile oluşturulan popülasyonun meyvelerinde yapılmıştır. Hassas 'US28' ve dayanıklı 115-4 hattının melezlenmesinden elde edilen F₂ popülasyonundaki RAPD analizi, hastalığa dayanıklılıkta QTL'i belirlemede faydalanılmıştır.

Dayanıklı genlerle bağlantılı moleküler işaretleyicilerin ıslahta kullanılması ıslahın başarısını arttırmaktadır. Moleküler işaretleyici teknolojisi, bir ya da birden fazla patojene dayanıklılığı tek bir hatta

toplamayı sağlamaktadır. Piramit sistemi olarak adlandırılan bu teknikte bir hat birden fazla dayanıklılığı bünyesinde bulundurmaktadır. Yapılan çalışmada; *TMV* (dayanıklı gen *Tm2a*), *Verticilium dahliae* (*Ve* geni) ve *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (*Frl* geni) hastalıklarına dayanıklı Momor ve *Verticilium dahliae* (*Ve* geni), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*I* ve *I2* geni), *Stemphylium spp.* (*Sm* geni) ve *Meloidogyne incognita* (*Mi* geni) hastalıklarına dayanıklı Motelle melezlenmiştir. Elde edilen F_1 'ler kendilenerak F_2 'ler elde edilmiştir. Bu aşamada *I2*, *Mi*, *Tm2a* ile bağlantılı CAPS işaretleyicisi ve *Frl* ile ilişkili RAPD işaretleyici kullanılarak moleküler analiz yapılmıştır. Sonuçta 4 hastalığa dayanıklı homozigot genleri taşıyan 20 F_4 ve 2 F_3 genotipi elde edilmiştir (Barone et al., 2005).

Vincent et al., (2001) siyah küf çürüklük etmeninin dayanıklılık kaynağı *L. cheesmanii* ile yaptıkları çalışmada, RFLP ve PCR'a dayalı işaretleyiciler kullanmışlardır. Geriye melezleme ve kendileme generasyonlarında MAS kullanılmıştır.

Danesh et al., (1994), bakteriyel solgunluğa dayanıklılığın çalışıldığı araştırmada dayanıklı ve hassasların melezlenmesi ile elde edilen 71 F_2 bitkisi, 79 DNA işaretleyicisi ile analiz edilmiştir. Kök ve sürgün inokülayonu yapılarak, 0-5 skalası kullanılmıştır. Toplam 290 RFLP araştırılmış fakat yalnızca 67'si açılım analizinde seçilmiştir. Polimorfik RFLP işaretleyicileri 59'u domates genetik haritası üzerinde 11 bağlantı grubu ile haritalanmıştır.

Kawchuk et al., (1998) dominant *verticilium* solgunluğu geni (*Ve*) ile yapılan çalışmada RAPD moleküler işaretleyici kullanılmış, dayanıklı

'Craigella' ile hassas 'Ailsa Craig' Resiprokal olarak melezlenmiş ve F₂ popülasyonundaki 600 bitki *Ve* için taranmış, F₂ bitkileri kendilenerek de F₃ bitkileri elde edilmiştir. *Ve* lokusu 0.67 ± 0.49 cM'dan az bulunmuştur.

Diwan et al., (1999) domateste *Ve* geni ile ifade edilip, tek dominant gen tarafından kontrol edilen *Verticillium dahliae* ırk 1'in haritalamasını yaptıkları çalışmada, RI, F₂ ve IL olmak üzere 3 farklı haritalama popülasyonu kullanmışlardır. Tüm haritalama popülasyonları, 9. kromozomun kısa kolu üzerinde RFLP işaretleyicisi GP39 ile bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir.

Ji and Scott, (2006) dayanıklılığın 3 lokus tarafından idame ettiği Domates Sarı Yaprak Kıvrıklığı (TYLCV) RAPD işaretleyicileri UBC697 ve UBC621 1. bölge (*Ty-1*); UBC264, UBC169, UBC197 ve UBC365 2. bölge; UBC131, UBC137, UBC236 ve UBC389 3. bölgeden polimorfizm göstermiştir. Bu işaretleyicilerin arasından UBC697, UBC264 dayanıklı genler ile ilişkili bulunmuştur. Çalışmada bu işaretleyiciler ko-dominant işaretleyici olan SCAR'a çevrilmiştir.

Doğanlar et al., (1998) mantarimsi kök çürüklüğüne (*Pyrenochaeta lycopersici*) dayanıklılığı ifade eden *Py-1* genini haritalamak için RAPD ve RFLP işaretleyicilerini kullanmışlardır. OPW-04, OPC-02, OPG-19 primerleri NIL arasında polimorfizm göstermiştir. F₃ bitkileri RAPD işaretleyicisinin *Py-1* geni ile bağlantısını onaylamak için kullanılmış, OPW-04, OPC-02 klonlanmış ve domates bağlantı haritasında RFLP gibi haritalanmış, 3. kromozomun kısa kolunda TG40 ve CT 31'in arasında yer almıştır.

Behare et al., (1991) dört *Stemphylium* türünün neden olduğu Gri yaprak lekesi hastalığına dayanıklı geni (*Sm*) RFLP kullanarak haritaladıkları çalışmada, 124 F₂ bitkisi kullanmışlar ve *Sm* geninin T10 ve TG110 arasında bulunduğunu bildirmişlerdir.

Dickinson et al., (1993) RFLP ve RAPD işaretleyicileri ile *Cladosporium fulvum*'a dayanıklılık için kullanılmıştır. Dayanıklılığı ifade eden *Cf-2* ve *Cf-5*'in domatesin 6. kromozunda, aynı bölgede olduğunu belirlemiştir. Bu bölge *GP79* ve *Aps-1*'in arasında ve nematoda dayanıklılığı ifade eden *Mi* geni ile benzer olduğu ortaya konulmuştur. Çalışmada RAPD işaretleyicileri ile *Cf-2* ve *Cf-5* genlerini taşıyan 'MoneyMaker' arasında polimorfizm elde edilmiş, RFLP ile edilememiştir.

Staniaszek, (2007) domateste *fusarium oxysporum f.sp.lycopersici*'ye dayanıklı homozigot 2 hat 'A238' (hassas) ve 'A241' (dayanıklı) melezlenerek, F₁ hibrit ve F₂ populasyonları elde edilmiştir. Ebeveyn bileşenleri ve bulk segregant analizlerinin polimorfizmi 712 RAPD DNA primerleri ve 100 inter simple dizilim tekrar primerleri ile yapılmıştır. Domateste 11 kromozomda ve patateste spesifik PCR işaretleyicilerinin polimorfizminde çalışılmıştır. İki işaretleyici *I-2* geni ile bağlantılı olarak tanımlanmıştır. *I-2* geni ve işaretleyici arasında 11.7 cM mesafe hesaplanmıştır. Bu iki işaretleyicinin dayanıklılık ıslahında, dayanıklı genotipleri belirlemek için kullanılabileceği belirtilmiştir.

Domateste *fusarium oxysporum f. sp. radidis lycopersici*'ye dayanıklı *Frl* lokusu ve tütün mozaik virüsü'nün birçok ırkına dayanıklılığı taşıyan *Tm-2* lokusu arasındaki ilişkinin araştırıldığı

çalışmada, 'IRB-301-31' ıslah hattı ile 'Motelle' melezlenerek, 222 F₂ bitkisi kendilenmiş ve her bir F₃ grubundan 15-60 fide *fusarium* ve TMV'nin "0" ırkına dayanıklılık testi yapılmıştır. *Frl* ve *Tm-2* arasında 5.1 ± 1.07 map units oranında sıkı bir bağ bulunduğunu göstermiştir (Vakalounakis et al., 1997).

RAPD DNA işaretleyicilerinin *Frl* ile bağlantısının kurulduğu çalışmada, hassas ve dayanıklı domates hatları, 1000 random 10 mer primerler ve 3 uygun RAPD işaretleyicisi (UBC 116, 194, 655) kullanılarak taranmış, UBC 194 *Frl* ile bağlantılı bulunmuştur. Kodominant PCR işaretleyicisi TG101 *Frl* ile bağlantılı bulunmuş, TG101 ve dört RAPD işaretleyicileri kullanarak, *Frl* üzerinde geri melez popülasyonunda 950 bitkide benzer grupta olduğu ortaya konmuştur. TG101, 655, 116, 194 polimorfik allel, *Frl* ile bağlantılı bulunmuştur. Bu popülasyonda UBC 194 *Frl*'den 5.1 cM uzaklıkta yer almıştır (Fazio et al., 1999). Ancak bulunan bu işaretleyiciler *Frl* genine uzakta olduğu için mütehakip generasyonlarda devamlılığı sağlanmamış ve ıslahta kullanımı mümkün olamamıştır

PCR'a dayalı kök ur nematodlarına dayanıklılığı ifade eden *Mi* geni ile bağlantılı kodominant işaretleyicilerin geliştirildiği çalışmada birçok işaretleyici tanımlanmıştır. REX-1 işaretleyicisi, *Mi* genine Aps-1'den daha yakın bulunmuştur, homozigot ve heterozigot bireylerde hızlı ve rutin bir şekilde ayırt edilmiştir (Williamson et al., 1994).

Sw-5 lokusu domateste Domates Lekeli Solgunluk Virüsüne (TSWV) dayanıklılığı ifade edip, tek dominant gen tarafından kontrol edilmektedir. Stevens et al., (1995)'de yaptığı çalışmada *L. esculentum*X

L. penelli F₂ populasyonunda TSWV'ye dayanıklılık için açılım yapılmıştır. Bir RAPD işaretleyicisinin (GAGCACGGGA) 2200 bp'de oluşturduğu lokus ile *Sw-5*'e bağlantılı olduğu belirlenmiştir.

Lycopersicon penelli'den elde edilen *I-3* geni *fusarium oxysporum f.sp.lycopersici*'nin 3.'cü ırkına dayanıklılığı ifade etmektedir. PCR tabanlı dizilim, SCAR, CAPS ve RGA işaretleyicileri, *I-3* lokusunun etrafında MAS için kullanılabilir çok yakın işaretleyiciler olduğu belirlenmiştir (Hemming et al., 2004).

Dünya'da hızlı bir yayılım gösteren powdery mildiyö (külleleme)'ye dayanıklılık *ol-2* geni ile ifade edilmektedir. PCR'a dayalı RAPD ve AFLP markırları ile çalışılmış ve hassas Süper Marmande çeşidi ile dayanıklı *L. esculentum* var. *cerasiforme* melezlenerek F₂ populasyonu oluşturulmuştur. BSA (Bulk Segregant Analizi) yapılmış ve 1500 bp'de RAPD işaretleyicisi OPU3₁₅₀₀ hassas bulklarda tespit edilmiştir. Bulunan RAPD işaretleyicisi CAPS'e çevrilerek işaretleyici yardımcı seleksiyonda kullanılmıştır (Giovanni et al., 2004).

Ohmori et al., (1996) domates mozaik virüsüne (TMV) dayanıklılığı ifade eden *Tm-1* geni ile bağlantılı 6 RAPD işaretleyicisi tanımlamışlar, daha sonra da bu işaretleyicileri SCAR'a çevirmişlerdir.

Ohmori et al., (2000) domates mozaik virüsüne (TMV) dayanıklılığı ifade eden, *L. peruvianum* dayanıklılık kaynağı olan *Tm-2* genine bağlantılı işaretleyici bulmak için 3 SCAR ve 3 RAPD işaretleyicisi ile çalışmışlardır. SCN131000, SCE16900 ve SCG09700 SCAR primerleri *Tm-2* ve *Tm-2a* allellerinin seçiminde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Dax et al., (1998) *Tm2²* ile ifade edilen Domates mozaik virüsüne (TMV) dayanıklılık için yaptıkları araştırmada, RAPD işaretleyicileri ile hassas, dayanıklı ve NIL tarama yapmış, polimorfik elde edilen bantları klonlayıp dizilim ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışmada SCAR işaretleyicisine çevrilmiş, böylelikle açılım popülasyonunda homozigot ve heterozigot bireylerin ayrılabilmesi sağlanmıştır.

Domateste *Phytophthora infestans*'a dayanıklılık geninin SSR işaretleyicileri ile bağlantısının kalıtım analizi ve tanımlamasının yapıldığı çalışmada, 5 hassas hat ile dayanıklı CLN2037E melezlemesinden 241 F₂ bitkisi elde edilmiştir. Genetik haritalama ve bağlantı analizleri sonucunda hastalığın 9. kromozomda yer alan *Ph-ROL* geni ile kontrol edildiği, SSR işaretleyicisi TOM236 ile 5.7 cM uzaklıkta olduğu bildirilmiştir (Zhu Shan et al., 2006).

2.4. Bulk segregant analizi (BSA)

BSA, spesifik gen ya da genomik bölgenin hızlı bir şekilde işaretleyiciler ile taranması metodudur. Melezlemeden elde edilen popülasyonda seçilen karakter bakımından birbirinden farklı iki havuz oluşturulur. Böylelikle havuzlar arasındaki farklılık istenilen bölgeye ait olabilir. 3 RAPD işaretleyicisi marulda mildiyö hastalığına dayanıklılık için taranmış ve dayanıklı- hassas F₂ bitkilerinden iki ayrı bulk oluşturulmuştur (Michelmore et al., 1991).

Moury et al., (2000) biberde domates lekeli solgunluk virüsüne (TSWV)'ne dayanıklılığı ifade eden *Tsw* lokusuna ilişkili işaretleyici

bulmak için 4 RAPD işaretleyicisi kullanmış ve bulk segregant analizi yapmışlardır. 153 F₂ bitkisi ile çalışılmış ve ilişkili bulunan RAPD, CAPS işaretleyicisine çevrilmiştir. Bu işaretleyicinin *Tsw*'ye yakınlığı 0.9-+0.6 cM olup, işaretleyici yardımcı seleksiyonda (MAS) kullanılabilir.

Soya mozaik virüsüne (SMV) dayanıklı moleküler işaretleyicilerin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmada, dayanıklı PI96983 ve hassas Nannong 1138-2 melezlenerek F₂ popülasyonu oluşturulmuştur. Popülasyon içinden 15 dayanıklı ve 15 hassas DNA örneği ile iki bulk meydana getirildikten sonra SSR işaretleyicileri ile ebeveyn ve bulklerde tarama yapılmıştır. F₂'deki 5 SSR işaretleyicisi Sat_297, Sat_234, Sat_154, Sct_033 ve Sat_120 RSC14 ile bağlantılı olup, 14.5 cM, 11.3 cM, 4.3 cM, 3.2 cM ve 6 cM genetik uzaklıkta bulunmuştur (Li Chao et al., 2006).

Qing-Hua et al., (2003) Pirinçte *Magnaporthe grisea* dayanıklılığı ifade eden Pi15 geninin Pii geni ile ilişkili olduğu bildirmiştir. Fakat son çalışmalar 6. kromozomda olduğu bildirilen Pii geninin 9. kromozomda yer alabileceğini ortaya koymuştur. Pi15 geninin kromozomal yerinin belirlenmesi için bağlantı analizi kullanılan moleküler işaretleyiciler, 15 dayanıklı, 141 hassas bitkiden oluşan F₂ haritalama popülasyonunda bulk segregant analizi (BSA) yapılmıştır. G103 işaretleyicisi Pi15 genine % 5.7 ± 2.1 rekombinasyon ile bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Chague et al., (1997) domates sarı yaprak kıvrıcılığına (TYLCV) dayanıklılık için bulk segregant analizini (BSA) kullandığı çalışmasında, F₄ hatlarını dayanıklı ve hassas iki havuza ayırmıştır. Her iki havuzu 600

primer ile taramış ve 4 RAPD işaretleyicisini dayanıklılık ile ilişkili bulmuştur. F₂ populasyonunda yapılan analiz ile bütün işaretleyiciler, 17.3 cM mesafe ile benzer bağlantı grubunda haritalanmıştır.

Shashidar et al., (2005) Pirinçte tane verimi için SCAR, RAPD ve mikrosatellitlerin kullanıldığı çalışmada, en yüksek ve en düşük tane verimini veren 10 hattan iki havuz oluşturulmuştur. 200 RAPD primeri, haritalama populasyonundaki 89 genotipte taranmış, OPAE-09 ve OPAE-14 primerlerinin uygun bantlar verdiği bildirilmiştir. OPAE-09 yüksek tane verimi için pozitif bir işaretleyici iken, OPAE-14 düşük tane verimli bitkilerin eliminasyonu için kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır.

Jung Kim et al., (2007), biberde tütün mozaik virüsüne dayanıklılığı ifade eden L⁴ lokusuna ilişkili moleküler işaretleyici geliştirmek için 512 AFLP primer kombinasyonu kullanmışlardır. Hassas ve dayanıklı DNA'lardan oluşan iki havuzda 5 birey yer almıştır. Toplam 19 primer çiftinden dayanıklı havuzda skorlanabilen bant elde edilmiştir.

Czembor, (2004) arpada küllemeye dayanıklılık *Mla* lokusu ile ifade edilmekte olup, bu çalışmada RAPD işaretleyicisi bağlantılı *Mla* lokusu belirlemede BSA kullanılmıştır. 385 RAPD primeri dayanıklı-duyarlı ebeveynler ve bulklarda taranmış, OPAA3₄₀₀ primeri *Mla* lokusuna 10 cM mesafede bulunmuştur.

Chunwongse et al., (1998), *L. pimpinellifolium* L 3708'den mildiyöye dayanıklı *Ph-3* genini haritaladıkları çalışmada, AFLP ve Bulk segregant analysis (BSA) kullanmışlardır. F₂ populasyonu için hassas 'CLN657-BC1F2-274-0-15-4' hattı ile dayanıklı L3708 melezlenmiştir.

Hastalık inokülasyonundan sonra 9 dayanıklı ve 8 hassas bitki DNA'sından oluşan dayanıklı ve duyarlı iki havuz oluşturulmuş, 120 AFLP primer kombinasyonu bu havuzlarda ve dayanıklı- duyarlı ebeveynlerde taranmıştır. 6 çift DNA bantları, dayanıklı ebeveyn ve dayanıklı havuz ya da hassas ebeveyn ve hassas havuz ile uyumlu bulunmuştur. Bu primerler F₂ bitkilerinde taranmış ve bu lokus ile hastalığa dayanıklılık arasında korelasyon bulunmuştur. 9. kromozom üzerinde RFLP işaretleyicileri kullanarak haritalanmıştır. Bu hastalıkla ilgili olarak iki gen kontrolüne (7. kromozomda *Ph-1* ve 10. kromozomda *Ph-2*) ilave olarak *Ph-3* geni bu çalışma ile bildirilmiştir.

Hung Lin et al, (2006) 200 RAPD primeri kullanarak domateste sıcağa toleranlık özelliklerinde ilişkilendirmeye çalışmışlardır. 43 F₇ RIL, CL5915 (sıcağa tolerant) ve L4422 (sıcağa hassas) melezinden elde edilmiştir. Çalışmada çiçek ve meyve sayısı, meyve tutumu, meyve ağırlığı verim özellikleri bakımından en yüksek ve en düşük bireylerden oluşan 7-8 DNA ile iki bulk oluşturulmuştur. İki ebeveyn ve iki bulk arasında toplam 200 primer taranmış, 106 farklı bant elde edilmiş, 22'si polimorfizm göstermiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada; Türkiye’de ve Dünya’da insan beslenmesinde önemli yer teşkil eden domatesin, yetiştiriciliği esnasında %20-60 oranında verim kaybına neden olan, *Fusarium oxysporum f.sp. radialis lycopersici* (FORL) hastalığına karşı dayanıklılık ıslahında kullanılabilen yakınlıkta moleküler işaretleyicilerin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla gerçekleştirilen bu çalışmada kullanılan materyal ve izlenen yöntem aşağıda özetlenmiştir. Çalışma BATEM (Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü) ve Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkilerinde yürütülmüştür.

3.1. Materyal

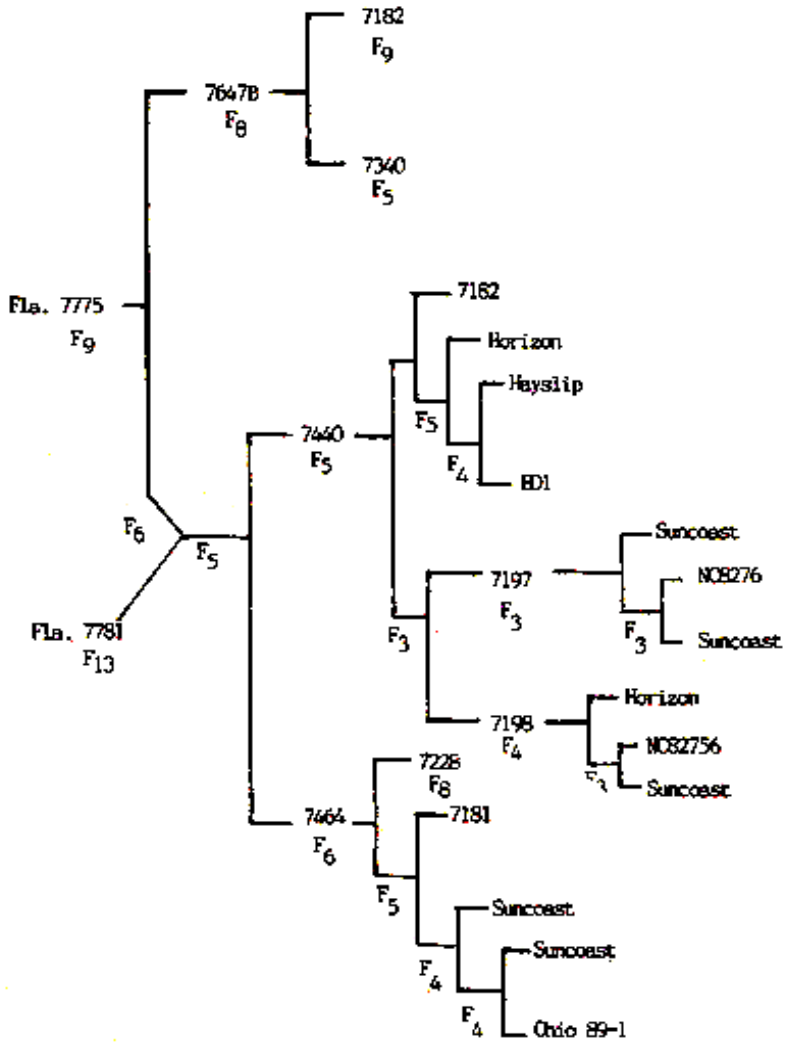
3.1.1. Bitkisel Materyal

Çalışmada *Fusarium oxysporum f.sp. radialis lycopersici*’ye dayanıklı Fla. 7781 nolu hat kullanılmıştır. Bu hat, Amerika, Gulf Coast Research and Education Center’da Domates Islahçısı J.W. Scott’dan temin edilmiştir.

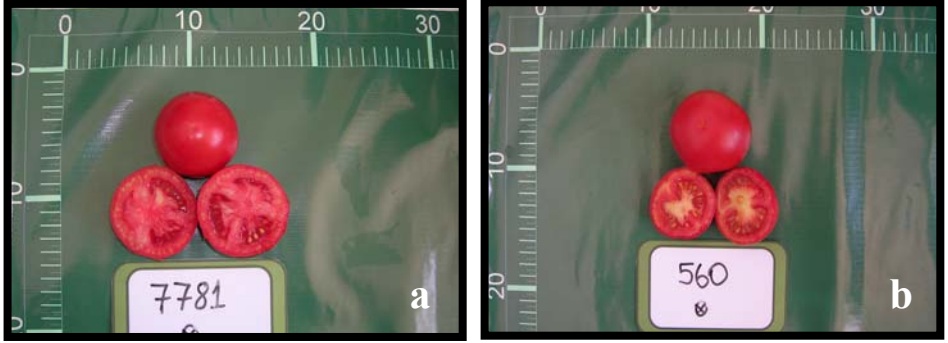
Materyal taze tüketime uygun olup, Florida gibi hastalığın yaygın olarak görüldüğü alanlarda dayanıklı çeşitlerin ebeveyni olabilecek yada yeni dayanıklı ıslah hatlarının geliştirilmesinde dayanıklılık kaynağı

olarak kullanılabilir niteliktedir (Scott and Jones, 2000). Fla. 7781'in orijini, Fla. 7440 ve Fla. 7464 nolu hatlar arasındaki melezlemelerden sonra F₁₃ generasyonuna gelmesiyle elde edilmiştir. FORL'ye dayanıklılık kaynağı, Ohio CR-6 için de dayanıklı ebeveyn olarak kullanılan Ohio 89-1'dir. F₅ generasyonunda Fla. 7775 ve 7781 nolu hatlar birbirlerinden ayrılmış ve iki tane dayanıklı domates hattı elde edilmiştir (Şekil 3.1). Çalışmamızda sadece Fla.7781 dayanıklı ebeveyn olarak kullanılmıştır (Şekil 3.2.a ve 3.3.a). Çünkü sadece bu materyalde *Tm-2* dayanıklılığı FORL dayanıklılığından ayrılmıştır, yani daha küçük *S. peruvianum* segmenti taşımaktadır, dolayısıyla *Frl* genine kısmen daha yakın işaretleyiciler bulunabileceği düşünülmüştür.

F₂ popülasyonunu oluşturmak için kullandığımız hassas 560 nolu hat ise Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsünde yürütülen örtüaltı yetiştiriciliğine uygun domates çeşitlerinin geliştirilmesi projesinden elde edilmiştir (Şekil 3.2.b ve 3.3.b) Her iki ebeveynin, IPGRI (Uluslararası Bitki Genetik Kaynakları Enstitüsü) tarafından belirlenen karakterizasyon kriterleri dikkate alınarak morfolojik karakterizasyonları yapılmıştır. Dayanıklı materyal yarı sırk özelliğinde olup, yaklaşık 170 g iken hassas ebeveyn örtüaltı yetiştiriciliğine uygun sırk tipte ve 100 g'dır (Çizelge 3.1 ve 3.2).



Şekil 3.1. Dayanıklı ebeveyn (Fla. 7781)'in pedigreesi (Scott ve Jones., 2000)



Şekil 3.2. a; dayanıklı ebeveyn meyve resmi (Fla. 7781) b; hassas ebeveyn meyve resmi (560),



Şekil 3.3 a; dayanıklı ebeveyn bitki resmi (Fla. 7781)



Şekil 3.3. b; hassas ebeveyn bitki resmi (560),

Çizelge 3.1. Dayanıklı ve hassas ebeveynin bitki ve yaprak özellikleri

No	Bitkinin Yapısı	Yetiştirme Şekli	İlk Çiçek Sal. Gövde Uzunluğu (cm)	İlk Sal. Meyve Sayısı	Gövde Tüylülüğü	Gövde Kalınlığı (mm)	Boğum Arası Uzunluk (cm)	Yaprak Duruşu	En/Boy (cm)	Yaprak Rengi	Yaprak Tipi
Fla.7781	Orta	Yarı Sırik	28	9	Yok	10.7	15	Yere Doğru,	36-34	Orta Yeşil	1
560	Orta	Sırik	27	13-14	Hafif Tüylü	14	17	Yukarı, Seyrek	27-28	Orta Yeşil	1

Çizelge 3.2. Dayanıklı ve hassas ebeveynin meyve özellikleri

No	Meyve sertliği	Çiçek Salkımı Gelişimi	Çiçek Ren. Sal. Homojenliği	Meyve Şekli	Meyve en/boy (mm)	Lop Sayısı	Meyvede Yeşil Yaka	Meyve Rengi*	Ort. Ağırlık (gr)	Meyve Çek. Evi Büyüklüğü	Meyve Et Kalınlığı (mm)
Fla.7781	Orta Sert	Bileşik	Sarı-Homojen	Yüksek Yuvarlak	68/72	3-4	Yok	2-3	177	Orta	5.54
560	Orta Sert	Basit	Sarı-Homojen	Basık	54/49	3-4	Yok	4	102	Orta	7-8

*0-5 Skalası kullanılmıştır.

3.1.2.Fungal Materyal

Çalışmada kullanılan fungal materyal, Can vd., (2003)'nın Mersin ve Adana'nın örtüaltı domates yetiştiriciliği yapılan alanlarından izole ettikleri FORL izolatıdır.

Çalışmalarında solgunluk symptomu gösteren bitkilerden elde ettikleri *Fusarium oxysporum* izolatları, Vejetatif Uyumluluk Grupları (VCG) ile testlenmiş ve *Fusarium oxysporum f.sp. radicans lycopersici* (FORL) olarak belirlenmiştir. Ayrıca FORL izolatlarının VCG 0090 II ve VCG 0091 gruplarına ait olduğu ortaya konmuştur. Elde edilen funguslar daha sonraki çalışmalar için +4°C'deki buzdolabında muhafaza altına alınmıştır.

Bu çalışma kapsamında Amerika, Gulf Coast Research and Education Center (J.W. Scott)'dan *Fusarium oxysporum f.sp. radicans lycopersici* izolatı da temin edilmiştir. Getirilen bu izolat, denemede dayanıklılık kaynağı olarak yer alan Fla. 7781'in testlenmesinde kullanılmıştır. Baysal vd., (basımda) tarafından yapılan çalışmada Türkiye izolatı ve Amerika izolatı ISSR yöntemiyle karşılaştırılmıştır. Araştırma sonucunda her iki izolat arasında herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir.

3.2.Yöntem

Fla. 7781 hattında öncelikle dayanıklılığını doğrulamak için Enstitüdeki *fusarium* izolatu ile testlenmiştir. Testleme işlemi Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsünün (BATEM) Sebzeçilik bölümündeki klima kontrollü seralarda yapılmıştır. Şekil 3.4. a, b’de elde edilen sonuçlar doğrultusunda dayanıklılık ve duyarlılık teyit edilmiş bitkiler görülmektedir. Testleme sonrası dayanıklı bitkiler tohum eldesi için seraya aktarılarak kendilemesi yapılmıştır. Çalışmada da populasyon oluşturmak için teksel melezlemeler yapılmıştır. Aşağıda, uygulanan yöntemler sırasıyla verilmiştir.



Şekil 3.4 a, b Hassas ve dayanıklı ebeveynlerin testlenmesi

3.2.1.Bitkilerin Yetiştirilmesi

Çalışmada kullanılan tüm bitkilerin tohumları steril torfla doldurulmuş kaselere ekilerek çimlenmesi sağlanmıştır. Şaşırtma büyüklüğüne gelen bitkilerde kotiledon yaprakları yere paralel durumda

olup, gövde kalınlaşması beklenmiştir. Bu aşamaya gelen bitkiler buharla steril edilmiş, 1:1 oranında torf perlit karışımı olan 45'lik viyollere aktarılmıştır.

Tohum ekiminden itibaren yaklaşık 3 haftalık bir sürecin sonunda bitkiler testleme büyüklüğüne gelmiştir. Dayanıklılık testlemeleri için iki litre hacimli saksılar kullanılmıştır. Bitkiler testleme sonuna kadar klima kontrollü 100 m² büyüklüğündeki seralara yerleştirilmişlerdir. Sıcaklıklar en düşük 14,3 °C, en yüksek ise. 23.7 °C olmuştur.

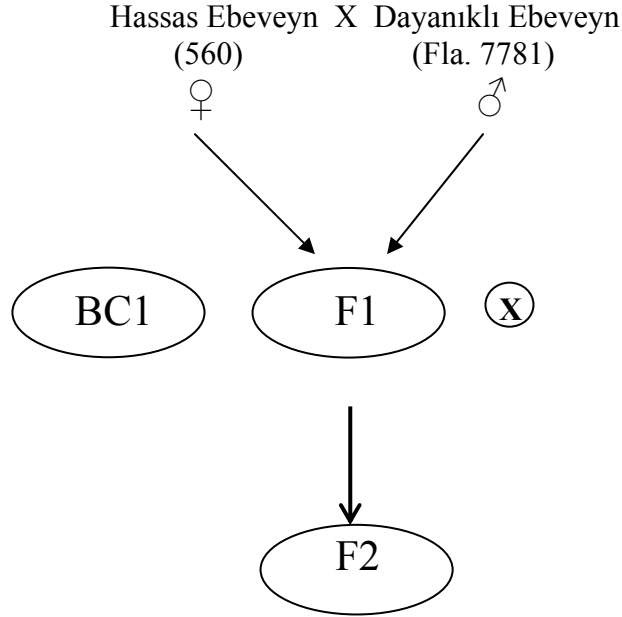
Melezleme ve kendileme için seraya aktarılacak fideler, 3–4 gerçek yapraklı büyüklüğe geldiklerinde, 40 x 100 cm mesafeyle tek sıralı olarak seraya dikilmiş ve can suyu ile sulama yapılmıştır. Dikim öncesi seranın farklı bölgelerinden alınan toprak örneği analiz edilmiş ve buna göre gelişme ve hasat dönemlerinde farklı olmak üzere gübrelemeleri yapılmıştır.

Yetiştiricilik esnasında gerekli kültürel işlemlerde Sevgican (1999)'da verilen metoda göre yapılmıştır.

3.2.2. Haritalama Populasyonlarının Oluşturulması

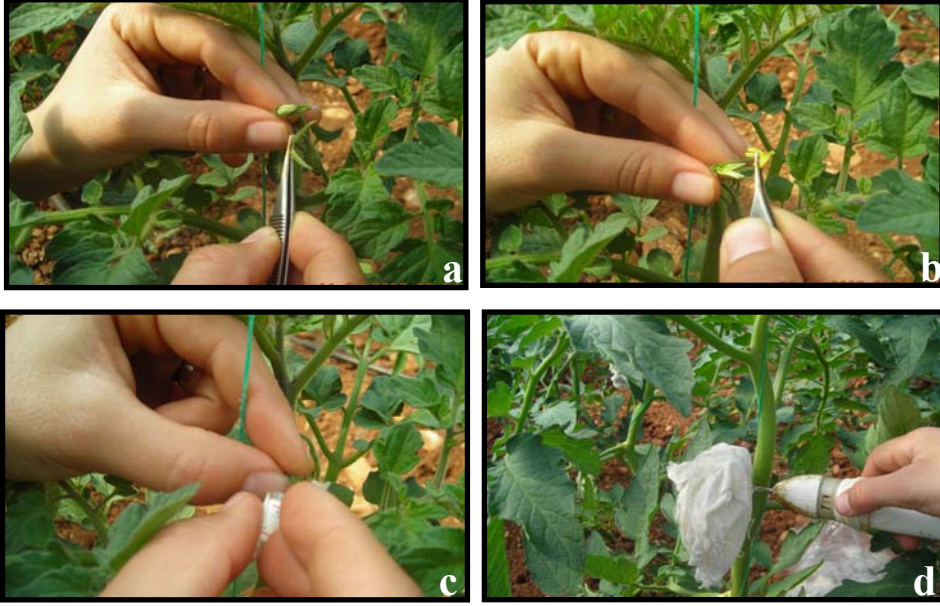
Haritalama populasyonunu elde etmek amacıyla, dayanıklı Fla. 7781 ve hassas 560 nolu hat serada melezlenmiştir. Melezlemede hassas hat ana ebeveyn, dayanıklı materyalde baba ebeveyn olarak kullanılmıştır. Vibratör yardımıyla baba bitkilerden alınan polenler, ana ebeveyne verilmiş ve F₁ bitkileri elde edilmiştir. F₁ bitkileri salkım

izolasyonu yapılarak kendilenmiş ve F₂ bitkileri elde edilmiştir. Ayrıca hassas ebeveyn ile geriye melezleme yapılarak BC1 populasyonu da oluşturulmuştur (Şekil 3.5)



Şekil 3.5. Melezleme şeması

Melezlemelerde anthesis safhasından bir gün önce ana olarak kullanılacak bitkilerin çiçek tomurcukları, anterleri patlamadan pens yardımı ile emasküle edilmiştir. Baba bitkilerden toplanan çiçek tozları ana bitkilerin dişi tepesine sürüldükten sonra melez numarası, melezleme tarihi içeren etiketler takılmıştır (Şekil 3.6.a,b,c). F₁ meyveleri kesilerek 6-8 saat kendi meyve suyunda fermente olması sağlanmış daha sonra yıkanarak tohumlar çıkartılmıştır. Oda sıcaklığında kurumaya bırakılan tohumlar, kullanılıncaya kadar +4 °C’de ki Enstitü tohum odasında muhafaza edilmiştir.



Şekil.3.6. a-b; Emaskülasyon işlemi, c; polen verme, d; kendileme ve vibratör yardımı ile titrasyon

F_2 popülasyonunun elde edilmesi için F_1 'ler kendilenmiştir. Kendileme işleminde ise kullanılacak çiçek tomurcukları anthesisten bir gün önce beyaz pamuklu bez keselerle ile izole edilmiş ve daha sonra bu salkımlarda vibratör yardımı ile tozlama gerçekleştirilmiştir (Şekil. 3.6.d). Bu salkımlardaki izolasyon meyve tutumu aşamasına kadar devam etmiştir. Meyve tutumları görüldükten sonra salkımlar üzerindeki tüller kaldırılmıştır. Tozlanmanın hemen ardından kendilenmiş çiçeklere etiket takılarak işaretlenmiştir. F_1 'lerin kendilenmesi ile F_2 bitkileri oluşturulmuştur. Şekil 3.7 F_1 bitkilerinin seradaki görünümü Şekil 3.8 Dayanıklı-duyarlı ebeveyn ve F_1 meyveleri görülmektedir.



Şekil. 3.7 F₁ bitkilerinin sera içindeki görünümü



Şekil.3.8. Dayanıklı ve hassas ebeveynin melezlenmesi ile elde edilen F₁ meyvelerinin görüntüsü

3.2.3. Dayanıklılık Testlemelerinin Yapılması

3.2.3.1. Spor Süspansiyonunun Hazırlanması

Fusarium türleri PDA (Patates Dekstroz Agar) gibi besin maddelerince zengin ortamlarda geliştirilirler. Testlemelerin yapılacağı sıvı besi ortamı Çizelge 3.3'deki stok süspansiyon çözeltisi bileşenlerinden oluşmaktadır. Çizelge 3.4 de ise süspansiyon çözeltisi bileşenleri yer almaktadır. Hazırlanan ortamlar otoklavlanarak steril edildikten sonra fungus kültürü petri kaplarında 24°C'de 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlıkta olmak üzere mor ışıkta 10 gün süreyle çoğaltılmıştır. Alınan diskler hazırlanan solüsyona çeker ocak altında

aktarılmıştır. Süspansiyon inokulum olarak kullanılmak üzere dairesel bir çalkalayıcı üzerinde 8 gün boyunca 50 devir/dakika süreyle çalkalanmıştır. Şekil 3.9’ da testlemeye hazır inokülasyonun, testleme öncesi inokülasyonun spor yoğunluğu Thoma lamı kullanılarak saptanmış ve bitkilerin testlenmesi sırasındaki spor yoğunluğu 1×10^6 konidi/ml’ye ayarlanmıştır (Gordon et al., 1989; Zink and Gubber, 1986; Yeşilova ve Karaca, 2007).



Şekil 3.9. Testlemeye hazır inokülasyon

Çalışmada kullanılan izolatın patojenitesinin azalmaması için reizolasyonlar da yapılmıştır. Re-izolasyon işlemi için hastalıklı bitki kısımlarından alınan doku parçaları (3-4 mm) 2 dakikalık süre ile % 0.5’lik sodyum hipokloritten geçirilmiştir. Yüzey dezenfeksiyonuna

tabii tutulan parçalar 3 defa steril saf sudan geçirildikten sonra steril kurutma kağıtlarında 2 saat süreyle kurutulmuştur. Kurutulan örnekler %2'lik Patates Dekstroz Agar (Difco) içeren petri kaplarına her birine 5 adet doku örneği gelecek şekilde yerleştirilmiştir. İnkübasyon dönemi sonunda (24°C'de 7 gün) besi yerinde gelişen fungal kolonilerin cins düzeyindeki teşhisleri mikroskop altında morfolojik yapılarına bakılarak gerçekleştirilmiştir (Singleton et al.,1992)

Çizelge 3.3. Stok süspansiyon çözeltisi bileşenleri

A. Kültür ortamı		
1. Temel ortamlar (1 litre su için)		
A çözeltisi	Kalsiyum Nitrat	100 g
	Potasyum Nitrat	25 g
B çözeltisi	Potasyum Sülfat	25 g
C çözeltisi	Monopotasyum Fosfat	12.5 g
D çözeltisi	Bipotasyum Fosfat	12.5 g
E çözeltisi	Sitrik Asit	25 g
	Malik Asit	25 g
Oligoelementler	Demir (Sequestrin 138)	40 g
	Mangan Sülfat	3 g
	Bakır Sülfat	3 g
	Çinko Sülfat	3 g
	Borax	6 g

Çizelge 3.4. Süspansiyon çözeltisi bileşenleri

Sıvı Sentetik Ortam	
A çözeltisi	20 ml
B çözeltisi	20 ml
C çözeltisi	20 ml
E çözeltisi	1 ml
Oligoelementler	1 ml
Sakkaroz	50 g
Malt	5 g
Destile Su	1 l'ye tamamlanır

3.2.3.2. İnokülasyon

Fusarium'a karşı dayanıklılık için yapılan testlerde inokülasyon yöntemi olarak fide kök daldırma metodu kullanılmıştır. Fideler 2-4 gerçek yapraklı oluncaya kadar serada yetiştirilmişlerdir. Testleme büyüklüğüne gelen fideler viyollerden çıkartılarak akan su altında yıkanmış ve kökleri torf-perlit karışımından arındırılmıştır (Şekil 3.10). İnokülasyon yapılacak fidelerin kökleri traşlandıktan sonra 10^6 konidi/ml konsantrasyonda hazırlanan süspansiyona 5 dakika süre ile daldırılmıştır. Kontrol bitkileri de akan su altında yıkandıktan sonra süspansiyon yerine suya daldırılmıştır (Gordon et al., 1989; Korolev et al., 2000; Vakalounakis and Fragkiadakis, 1999).



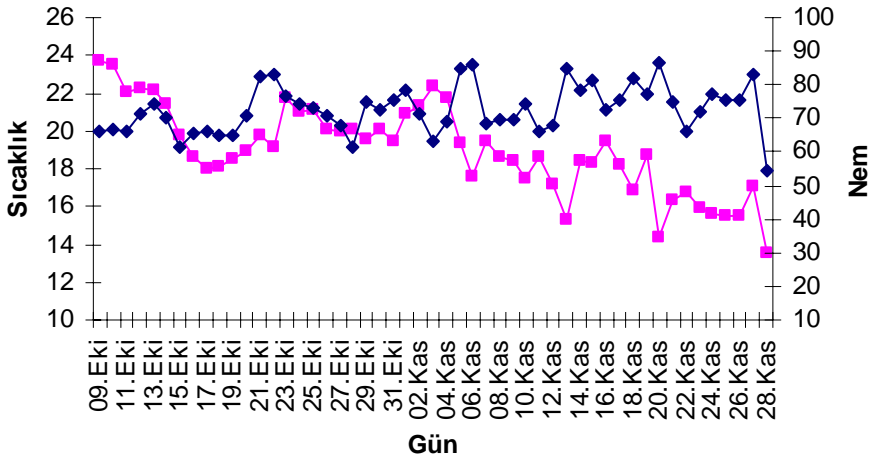
Şekil 3.10. Testlemeye hazır fideler ve inokülasyon

Fideler daha sonra buharla steril edilmiş, torf- perlit karışımından oluşan yaklaşık 2 litre hacmindeki saksılara aktarılmış ve her saksıda dört bitki olacak şekilde dikimleri yapılmıştır (Şekil 3.11) Testlemede kullanılan kontrol bitkileri de saksılara dikilmiştir. Bitkiler klima kontrollü seralarda büyümeye bırakılmış ve testlemenin süresi olan 4 haftalık periyotta günlük sulamalar gübre kullanılmadan yapılmıştır. Ayrıca sera içine hobo cihazı konularak sıcaklık ve nem değerleri alınmıştır (Şekil 3.12.). Böylelikle patojenin istediği sıcaklık aralığı takip edilmiştir. Testleme boyunca en yüksek sıcaklık 23.7 °C iken en düşük sıcaklık 14.3 °C, en yüksek nem % 86.6, en düşük nem değeri de % 54.6 olmuştur. Testlemede 493 F₂, 476 BC1 bitkisi, 30 F₁, dayanıklı 'Fla. 7781' ve hassas '560' ebeveynlerinden 30'ar bitki kullanılmıştır.

Testlemede ebveyner ve F₁ bitkileri, 3 tekerrürlü, tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur.



Şekil 3.11. Testleme serasından görünüm (orijinal resim)



Şekil 3.12. Testleme süresince sıcaklık-nem değerleri

Denemenin kurulmasından sonra her hafta düzenli olarak gözlem yapılarak, hassas ve dayanıklı bitkiler tespit edilmiştir. Çalışmada Korolev et al., 2000 modifiye edilerek testleme sonuçları

değerlendirilmiştir. Buna göre 0= simptom göstermeyen bitkiler, 4= ölü bitkiler olacak şekilde skala kullanılmıştır. Şekil 3.13’de testelededen 9 gün sonra dağılım gösteren bitkiler görülmektedir. 28. günün sonunda hassas ve dayanıklı bitkiler simptomlara bakarak tespit edilmiştir.



Şekil 3.13. Testlemeden 9 gün sonraki görüntüler (orijinal resim)

3.2.4. Dayanıklılık Geninin Moleküler Olarak Haritalanması

3.2.4.1.DNA İzolasyonu

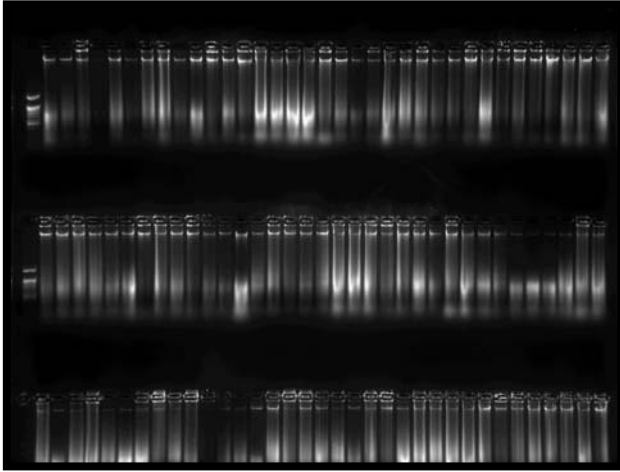
DNA izolasyonu için inoküle edilmiş 3 haftalık fidelerin yaprakları alınıp sıvı azotla muamele edilmiş (Şekil 3.14.) ve kullanılmıncaya kadar (-)80°C’de bekletilmiştir.

İzolasyonda CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) yöntemi kullanılmıştır (Aldrich and Cullis, 1993). Buna göre taze yaprak dokusu Çizelge 3.5’e göre hazırlanmış solüsyondan 1,5 ml alınarak porselen havanda ezilmiş, 2 ayrı ependorf tüpe 750’şer ml konularak

örnekler 65°C’de 2 saat bekletilmiştir. Daha sonra ekstraksiyon tüpü içerisine 600 µl cloroform: isoamylalcol (24:1) ilave edilmiş ve tüpler vortekslelendikten sonra 15 dakika 13 000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Tüplerde iki ayrı faz oluştuğu görülmüştür. Altta kalan katı kısımda (pellet) protein ve diğer kalıntılar çökelmiş, üstteki sıvı kısımda da DNA kalmıştır. Otomatik mikro pipet yardımı ile DNA içeren bu sıvı kısım yeni ependorf tüpe alınmış ve bu solüsyonun hacminin 2/3’ü kadar buzdolabında bekletilmiş olan soğuk isopropanol ilave edilmiştir. DNA’nın çökmesi için tüpler 10 dakika 13 000 bin rpm’de santrifüj edilmiş ve yıkama aşamasına geçilmiştir. DNA yıkama buffer’ı (% 76’lık etanol + 10 mM amonyum asetat) ile iki kez yıkanmıştır. Daha sonra etanol tüplerden uzaklaştırılarak ağzı açık bir şekilde kurutulmaya bırakılmıştır. Kuruyan tüplere 100 µl TE (1X) konularak, 65°C’de 2-3 dk. bekletildikten sonra 80°C’ye konmuştur. DNA kalitesi ve konsantrasyonunu belirlemek için 4 µl’lik DNA örnekleri % 1.5’luk agaroz jelde 75 V’da 45 dakika yürütülmüştür (Şekil 3.15.). Etidyum bromid ile boyanmış olan jel KODAK GELLOGIC 200 görüntüleme sistemi ile görüntülemesi yapılmıştır (Aldrich and Cullis, 1993; Boyacı 2007).



Şekil 3.14. Bitki örneklerinin sıvı azot ile muamele edilmesi



Şekil 3.15. DNA görüntüsü

Çizelge 3.5. CTAB Ekstraksiyon Buffer

Sol	100 ml için	Stok	Final konsantrasyonu
NaCl	28 ml	5 M	1.4 M
EDTA (pH=8)	4 ml	0.5 M (pH=8)	20 mM
Tris HCl (pH=8)	10 ml	1 M (pH=8)	20 mM
CTAB	2 gr		% 2
2- Mercaptoethanol	2 mL		% 2

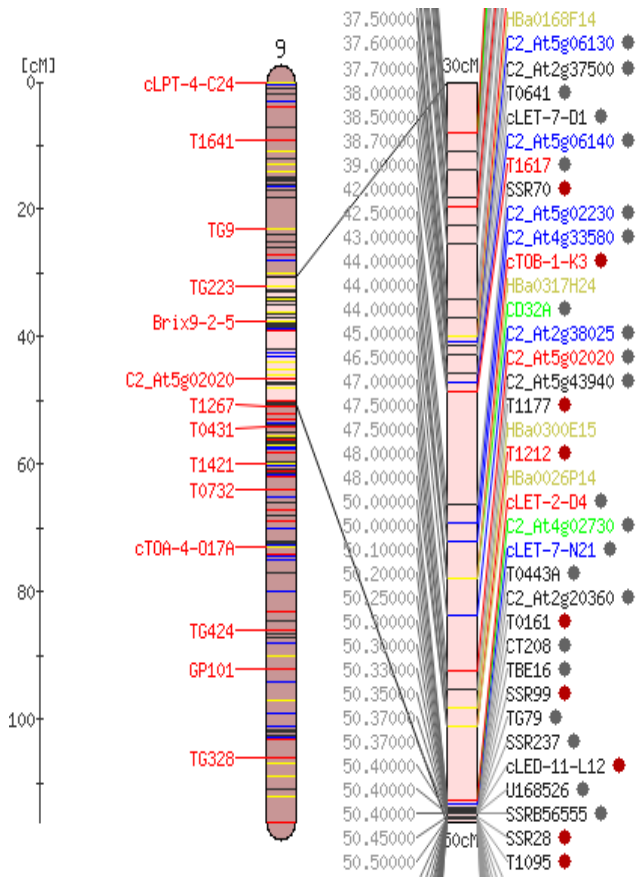
3.2.4.2. Bulked Segregant Analysis (BSA)

Fusarium oxysporum f.sp. radialis lycopersici'ye dayanıklılıkla ilgili moleküler işaretleyicilerin belirlenmesinde Bulked Segregant Analysis (BSA) yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntem herhangi bir gen ya da genomik bölgeye bağlı işaretleyici belirlemek için geliştirilmiş hızlı bir yöntemdir (Michelmore et al., 1991). Melezlemeden elde edilen F₂ popülasyonunda DNA örneklerinden *fusarium oxysporum f.sp. radialis lycopersici*'ye dayanıklı ve duyarlı bireylerden meydana gelen iki havuz oluşturulmuştur. Her bir havuzda 10'ar tane bireyin DNA'sı yer almıştır. Havuzdaki her bir bireyin DNA miktarı 14 ng olacak şekilde hazırlanmıştır. Haritalama popülasyonu için kullanılan moleküler işaretleyiciler hazırlanan havuzlarda, dayanıklı ve duyarlı ebeveynlerde taranmıştır.

Bulked Segregant Analysis (BSA) sayesinde F₂ popülasyonunu istenilen özellik bakımından temsil edecek bireylerde taramak mümkün olmuştur. İşaretleyicilerle yapılan tarama çalışmalarında, oluşturulan

havuzlar arasında tespit edilen polimorfik bant veya bantlar daha sonrasında F_2 popülasyonunda ki tüm bireylerde taranabilir. Böylelikle analiz sayısı azalmakta, işçilik ve kullanılan malzemeden de tasarruf sağlanabilmektedir.

3.2.4.3.Moleküler İşaretleyicilerin Kullanımı



Şekil 3.16. Domatesin 9. kromozomunda kullandığımız işaretleyicilerin yerleri (www.sgn.cornel.edu)

Çalışmanın moleküler kısmında Şekil 3.16.'da görüldüğü gibi domatesin 9. kromozomunda *Frl* genine yakın işaretleyicilerden 7 SSR ve 9 Cos işaretleyicisi seçilmiştir. Ayrıca 247 SRAP primer kombinasyonu, 476 RGA primer kombinasyonu ve 576 SRAP- Cos primer kombinasyonu da kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan Cos kombinasyonları 12 farklı enzim kesilmiştir. Aşağıda sırasıyla kullanılan primerler ve oluşturulan kombinasyonlar verilmiştir.

3.2.4.3.1.Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP)

Çizelge 3.6 ve 3.7 deki SRAP primerleri ile ebeveynler ve dayanıklı-duyarlı bulklar arasındaki farklılık incelenmiştir.

Çizelge 3.6. SRAP Forward primerleri ve dizilimleri (Budak vd., 2004)

SRAP Primerler	Forward (5'-3')
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC
Me3	TGAGTCCAAACCGGAAT
Me4	TGAGTCCAAACCGGACC
Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG
Me6	TGAGTCCAAACCGGACA
Me7	TGAGTCCAAACCGGACG
Me8	TGAGTCCAAACCGGACT
Me9	TGAGTCCAAACCGGAGG
Me10	TGAGTCCAAACCGGAAA
Me11	TGAGTCCAAACCGGAAC
Me12	TGAGTCCAAACCGGAGA
Me13	TGAGTCCAAACCGGAAG

Çizelge 3.7. SRAP Reverse primerleri ve dizilimleri (Budak vd., 2004)

SRAP Primerler	Reverse (5'-3')
Em1	GACTGCGTACGAATTAAT
Em2	GACTGCGTACGAATTTGC
Em3	GACTGCGTACGAATTGAC
Em4	GACTGCGTACGAATTTGA
Em5	GACTGCGTACGAATTAAC
Em6	GACTGCGTACGAATTGCA
Em7	GACTGCGTACGAATTCAA
Em8	GACTGCGTACGAATTCAC
Em9	GACTGCGTACGAATTCAG
Em10	GACTGCGTACGAATTCAT
Em11	GACTGCGTACGAATTCTA
Em12	GACTGCGTACGAATTCTC
Em13	GACTGCGTACGAATTCTG
Em14	GACTGCGTACGAATTCTT
Em15	GACTGCGTACGAATTGAT
Em16	GACTGCGTACGAATTGTC
Em17	GACTGCGTACGAATTGAG
Em18	GACTGCGTACGAATTGCC
Em19	GACTGCGTACGAATTTCA

SRAP-PCR reaksiyonu aşağıda belirtilen oranlara göre yapılmıştır.

	<u>Miktar</u>
DNA (ng)	2 µl
10xPCR Buffer	1,5 µl
Taq DNA polymerase(5unit/µL)	0,2 µl
dNTP (2.5 mM)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 µl
10 mM SRAP primer (Fw)	2 µl
10 mM SRAP primer (Rw)	2 µl
H ₂ O	3.8 µl
<u>Toplam</u>	<u>15 µl</u>

DNA Sentezlenmesi (SRAP):

DNA denatürasyonu aşaması; 94 °C 'de 5 dk

Primer hibridizasyon aşaması;

5 döngü (94°C 1 dk, 35°C 1 dk, 72°C 2 dk).

30 döngü (94°C 1 dk, 50s⁰C 1 dk, 72°C 2 dk)

Polimerizasyon aşaması; 72°C 5 dk

3.2.4.3.2.Simple Sequence Repeat (SSR)

Çizelge 3.8'de SSR primerleri ile ebeveynler ve dayanıklı-duyarlı bulklar arasındaki farklılık incelenmiştir.

Çizelge 3.8. SSR primerleri, dizilimleri ve kromozom üzerindeki yeri(www.cornell.edu)

SSR Primer	Dizilim (5'-3')	9. kromozom üzerindeki yeri (cM)
SSR28 F	ACCAAATGGAATGGGTCAA	50.45
SSR28 R	CCCTAAGACTAACGACAACCAA	50.45
SSR19 F	CCGTTACCTTGGTCCATCAC	51
SSR19 R	GGGAGATGCCACATCACATA	51
SSR155 F	TACATGGTGCTCAAACCTCGC	55.50
SSR155 R	TGGTTGAGAAGGACAGGTGA	55.50
SSR383 F	ATTGTACAAAGACCCGTGGC	57.30
SSR383 R	GTTGCACACTGGATCAATGC	57.30
SSR110 F	TGTAACGTCAAACCTCAGGTG	61.0
SSR110 R	CTCCGCAATGTGTTGTATGG	61.0
SSR99 F	GCCTCGGATTCAATAGCATT	50.35
SSR99 R	CACAAAGAAGCAAACAACCTCCA	50.35
SSR237 F	GTGGTAACGGCAAAGGGACT	50.37
SSR237 R	CTTATGGCCTTAGCAGCCAG	50.37

SSR-PCR reaksiyonu aşağıda belirtilen oranlara göre yapılmıştır.

	<u>Miktar</u>
DNA	2 μ l
10xPCR Buffer	1,5 μ l
Taq DNA polymerase (5u/ μ L)	0,2 μ l
dNTP (2.5 mM)	1 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 μ l
10mM RGA primer (Fw)	2 μ l
10mM RGA primer (Rw)	2 μ l
H ₂ O	4.8 μ l
<u>Toplam</u>	<u>15 μl</u>

DNA Sentezlenmesi (SSR):

DNA denatürasyonu aşaması; 95°C ‘de 30 sn

Primer hibridizasyon aşaması; 40 döngü (95°C 15 sn, 55°C 30 sn, 72°C 30 sn).

Polimerizasyon aşaması; 72°C 3 dk

3.2.4.3.3.Resistance Gene Analogue (RGA)

Çizelge 3.9’da RGA primerleri ile ebeveynler ve dayanıklı-duyarlı bulklar arasındaki farklılık incelenmiştir.

Çizelge 3.9. RGA primerleri ve dizilimleri (Mutlu vd, 2008)

RGA Primer	Dizilim (5'-3')
RLRRr F (1)	ACACTGGTCCATGAGGTT
XLRRf R (2)	CCGTTGGACAGGAAGGAG
CLRRf F (3)	TTTTTCGTGTTCAACGACG
CLRRr R (4)	TAACGTCTATCGACTTCT
S1 F (5)	GGTGGGGTTGGGAAGACAACG
AS1 F (6)	CAACGCTAGTGGCAATCC
Ptokin1 F (7)	GCATTGGAACAAGGTGAA
Ptokin2 F (8)	AGGGGGACCACCACGTAG
XLRRr F (9)	CCCATAGACCGGACTGTT
RLRRf R (10)	CGCAACCACTAGAGTAAC
Ptokin4 F (11)	AGTGTCTTGTAGGGTATC
NBSf F (12)	GGAATGGGNGGNGTNGGNAARAC
NBSr R (13)	YCTAGTTGTRAYDATDAYYYTRC
CSOR R (14)	TCAGGGTAGGTTATT
PtoFenS F (15)	ATGGGAAGCAAGTATTCAAGGC
CSOF F (16)	CGAAGAGAGAAGGTC
PtoFenAS F (17)	TTGGCACAAATTCTCATCAAGC
NBSAf F (18)	GGAATGGGKGGAGTYGGYAARAC
NBSAr R (19)	ATCATAACTTATTTTKAG
NBSBf F (20)	GGNATGGGYGGBRTHGGYAARAC
NBSBr R (21)	CARMGCYAAWGGYAADCC
KinaseCf F (22)	ATGGGAAGCAAGTATTCCAA
KinaseCr R (23)	AGTTTCCACAGCACATCACC
KinaseEf F (24)	AAGAAATTGCGGTAAAAAGGCTA

KinaseEr R (25)	AAGATTCTGGCCATCCCAAATC
GLPLFa R (26)	CATCCTAGGTCACGAAGCAT
Tlr1F1 F (27)	AATTATGCTTCTTCGACGTGSTG
GLPLRa R (28)	AGGATCGTGTCTATGATCTC
Tlr2F1 F (29)	GTGATKCCRRTTTTCTACGACGTT
Tlr3F1 F (30)	GGAAGTWAGRAAACAGAMSGGMGA
NB1as22F F (31)	GAARAAACATGCWATGCACTTAAA
NB2as31F F (32)	TAACCYATCGTAGCTGATTTTKAG
NB2as32F F (33)	TAAACYATCGTAAACCAACTCTKAG
NBK2as4F F (34)	ACATCATCAAGAAGRATAAGRACYYTC
NBK3as5F F (35)	ATTCTGCTWCCATTWCCAAACCA
G11NbsF1 F (36)	GGAGGAGTKGGWAARACWAC
G24R1 R (37)	CKWGTWGTMACAATAATYTTWGAWCC
G11NbsR1 R (38)	GTTGTYTTWCCMACWCC
G24F1 F (39)	GGATCAAARATTATTGTKACWACWMG
G13F1 F (40)	CTKGTKGTYTKGATGATRT
G14R1 R (41)	CGAGAWGTNRYAATAATYCTWGAWCC
G13R1 R (42)	TYATCATCMARMACMACMAG
G14F1 F (43)	GGATCAAGGATTATTRYAACWACWMG
G13R2 R (44)	TYATCATCMARMACMACMAA
G23R2 R (45)	CCAMACATCATCMARMAT
G23F1 F (46)	GTKYTKGATGATGKTGG
G23R1 R (47)	CCAMACATCATCMARMAC
GLPL2 R (48)	CAWAGMAARWGGVARWCC

Degenerate nucleic acid bases: R=A,G; Y=C,T; K=G,T; S=C,G; W=A,T; H=A,C,T; V=A,C,G; D=A,G,T; N=A,C,G,T

RGA-PCR reaksiyonu aşağıda belirtilen oranlara göre yapılmıştır.

	<u>Miktar</u>
DNA	2 µl
10xPCR Buffer	1,5 µl
Taq DNA polymerase (5u/µL)	0,2 µl
dNTP (2.5 mM)	1.5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1.8 µl
10mM RGA primer (Fw)	1 µl
10mM RGA primer (Rw)	1 µl
H ₂ O	6 µl
<u>Toplam</u>	<u>15 µl</u>

DNA Sentezlenmesi (RGA):

DNA denatürasyonu aşaması; 94°C 'de 3 dk

Primer hibridizasyon aşaması;

5 döngü (94°C 45 sn, 45°C 50 sn, 72°C 75 sn)

5 döngü (94°C 30 sn, 50°C 35 sn, 72°C 75 sn)

35 döngü (94°C 30 sn, 55°C 35 sn, 72°C 75 sn)

Polimerizasyon aşamasında 72°C 5 dk

3.2.4.3.4. Conserved Ortholog Set II (Cos II)

Araştırmada Domatesin 9. kromozomunda sentromere yakın bölgelerdeki (kromozom üzerindeki yerleri 52.0- 59.0 arası) Cos II işaretleyicileri kullanılmıştır (Çizelge 3.10). *Frl* ile ilişkili işaretleyici belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışmalarda *Frl*'nin domatesin 9.

kromozomunda yer aldığı belirtilmektedir (Fazio et al., 1999; Vakalounakis et al., 1997). Sol Genomics Network'ta da belirtilen (<http://www.sgn.cornell.edu>) domates genetik haritalarından faydalanarak bu bölgedeki Cos II işaretleyicileri çalışmanın başlangıcında tespit edilmiştir.

Çizelge 3.10. Cos II primerleri ve dizilimleri (www.sgn.cornell.edu)

Cos II Primer	Dizilim (5'-3')	9. kromozom üzerindeki yeri (cM)
C2_At2g29210 F (C1)	AGCAGGACACTCGATTCTCTAATAAGC	55.60
C2_At2g29210 R (C1)	TGCACTAAGTAGTAATGCCCAAAGCTC	55.60
C2_At1g03360 F (C2)	AGGCATACAGTTATCTTTCAGCAACAC	56.0
C2_At1g03360 R (C2)	AGAGCATTAGTACAGCGTCTTGGC	56.0
C2_At2g47890 F (C3)	ACAACACAGCACTTTTGTATTGCAGAGC	56.10
C2_At2g47890 R (C3)	TTGTGTTTTCCACAAGCAGCATTTCG	56.10
C2_At3g02680 F (C4)	ATGGCGGAGTTGCAAATTTAAG	58.0
C2_At3g02680 R (C4)	TGCAAAGCTATTCTGGGATGGAGC	58.0
C2_At3g63190 F (C5)	TTGGTGCAGCCGTATGACAAATCC	52.0
C2_At3g63190 R (C5)	TCCATCATTATTGGCGTCATACC	52.0
C2_At3g48120 F (C6)	ACAAATTGAGGCTGCTCATGATGAGG	59.0
C2_At3g48120 R (C6)	ACGCACACGATCACGCCAAGAAC	59.0
C2_At1g02910 F (C7)	TGAACCCACTCCCACTGCTGAGTC	57.70
C2_At1g02910 R (C7)	TGCTGTGTCGAATAGCACAAGAGC	57.70
C2_At3g63200 F (C8)	AAGTATGCCGTGCCACGTCAGC	52.0
C2_At3g63200 R (C8)	TCAACTCCTGGTCCCCTCTCC	52.0
C2_At4g02580 F (C9)	AACAAAACGGACCTTCCTTGGGA	52.0
C2_At4g02580 R (C9)	AGTTGCAACCTCATATACGAATTGG	52.0

3.2.4.3.4.1. Cos II PCR Ürünlerinin DNA Kesim Enzimleriyle Kesimi

12 farklı enzim ile 9 tane Cos II işaretleyicisi 37 °C'de 4 saat bekletilerek kesilmiştir. Kullanılan enzimler Çizelge 3.11'de verilmiştir.

Çizelge 3.11.DNA kesiminde kullanılan enzimler

Enzimler	Tanıdığı Bölge
BsuRI (HaeIII)	5'-G G [^] C C-3' 3'-C C [^] G G-5'
VspI (Ase I)	5'-A T [^] T A A T-3' 3'-T A A T [^] T A-5'
TaqI	5'-T [^] C G A-3' 3'-A G C [^] T-5'
TruI (MseI)	5'-T [^] T A A-3' 3'-A A T [^] T-5'
RsaI	5'-G T [^] A C-3' 3'-C A [^] T G-5'
NedI	5'-C A [^] T A T G-3' 3'-G T A T [^] A C-5'
AdeI (DraIII)	5'-C A C N N N [^] G T G-3' 3'-G T G [^] N N N C A C-5'
Dpn I	CH ₃ 5'-G A [^] T C-3' 3'-C T [^] A G-5' CH ₃
Hin6I (HinP1I)	5'-G [^] C G C-3' 3'-C G C [^] G-5'
HhaI	5'-G C G [^] C-3' 3'-C [^] G C G-5'
AsuII	5'-T T [^] C G A A-3' 3'-A A G C [^] T T-5'
MaeI	5'-C [^] T A G-3' 3'-G A T [^] C-5'

PCR reaksiyonu aşağıda belirtilen oranlara gre yapılmıştır.

	<u>Miktar</u>
DNA	2 μ l
10xPCR Buffer	1,5 μ l
Taq DNA polymerase(5unit/ μ L)	0,2 μ l
dNTP (2.5 mM)	2 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 μ l
Cos II primer (Fw)	2 μ l
Cos II primer (Rw)	2 μ l
H ₂ O	0.8 μ l
<u>Toplam</u>	<u>15 μl</u>

DNA Sentezlenmesi :

DNA denatürasyonu aşaması;	95°C ‘de 15 dk
Primer hibridizasyon aşaması;	35 dngü (95°C 30s, 72°C 1 dk).
Polimerizasyon aşaması;	72°C 3 dk

Enzimle Kesim:

10xPCR Buffer	2 μ l
Restriction Enzim	1 μ l
H ₂ O	7 μ l
PCR urunu DNA	10 μ l
<u>Toplam</u>	<u>20 μl</u>

3.2.4.3.4.2. Cos II (Conserved Ortholog Set II) ve SRAP Kombinasyonu

Çizelge 3.10'da ki Cos II primerleri ile Çizelge 3.6 ve 3.7'deki SRAP primerleri arasında 576 SRAP-Cos kombinasyonu kurulmuştur. Ebeveynler ve dayanıklı-duyarlı bulklar arasındaki farklılık incelenmiştir.

SRAP* Cos II kombinasyonları PCR reaksiyonu aşağıda belirtilen oranlara göre yapılmıştır.

	<u>Miktar</u>
DNA	2 µl
10xPCR Buffer	1,5 µl
Taq DNA polymerase(5unit/µL)	0,2 µl
dNTP (2.5 mM)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 µl
10 mM primer (Fw)	2 µl
10 mM primer (Rw)	2 µl
H ₂ O	3.8 µl
<u>Toplam</u>	<u>15 µl</u>

DNA Sentezlenmesi (SRAP*Cos II):

DNA denatürasyonu aşaması; 94°C 'de 5 dk

Primer hibridizasyon aşaması;

5 döngü (94°C 1 dk, 35°C 1 dk, 72°C 2 dk).

30 döngü (94°C 1 dk, 50s°C 1 dk, 72°C 2 dk)

Polimerizasyon aşaması; 72°C 5 dk

3.2.4.4. PCR ürünlerinin Görüntülenmesi

Çalışmada DNA örnekleri % 2.5'luk agaroz jelde 75 V'da 2-3 saat yürütülmüştür. Etidyum bromid ile boyanmış olan jel KODAK GELLOGIC 200 görüntüleme sistemi sistemi ile görüntülenmesi yapılmıştır. Kullanılan işaretleyici sistemlerden bulklar ve ebeveynler arasında dayanıklılarda var olup, hassaslarda olmaya polimorfik bandlar belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. *Fusarium oxysporum f.sp. radicans lycopersici* (FORL) İzolatı ile Testlemelerin Yapılması ve Dayanıklılığın Kalıtımı

FORL'a karşı dayanıklılık için yapılan testlemede fide kök daldırma metodu kullanılmıştır (Gordon et al.,1989; Korolev et al., 2000; Vakalounakis and Fragkiadakis, 1999). F₁, F₂, BC1 bitkileri, dayanıklı ve duyarlı ebeveynler FORL izolatı ile testlenmişlerdir. Testlemede 493 F₂ bitkisi, 476 BC1 bitkisi, 30'ar dayanıklı ve duyarlı ebeveynler ve 30 F₁ bitkisi kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. *Fusarium oxysporum f.sp. radicans-lycopersici* ile testlenen F₁, F₂, BC1 ve dayanıklı- hassas ebeveynlerin gösterdikleri reaksiyonlarının X² test sonuçları

Testlemeye alınan bitkiler	Gözlenen D:H	Beklenen D:H	Açılım oranı D:H	X ²
Ana (560)	0:30	0:30	0:1	-
Baba (Fla.7781)	30:0	30:0	1:0	-
F ₁ (560x Fla. 7781)	30:0	30:0	1:0	-
F ₂	375:118	369.75:123.25	3:1	0.298 (P=0.585)
BC1	252:224	238:238	1:1	1.64 (P=0.199)

X², S.D=1, %1 için 6.63, %5 için 3.84

$$X^2 = \frac{(\text{Gözlenen}-\text{Beklenen})^2}{\text{Beklenen}}$$

D: Dayanıklı H: Hassas (Duyarlı)

Çizelge 4.1'den de görüldüğü gibi testleme sonucuna göre dayanıklı ebeveynlerin hepsinin dayanıklı, duyarlı ebeveynin hepsinin duyarlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca dayanıklı ve duyarlı hatların melezlenmesinden elde edilen heterozigot F_1 'lerin de tamamının dayanıklı olduğu gözlenmiştir. İnokülasyondan bir ay sonra F_1 bitkilerinde dayanıklı ebeveynlere benzer şekilde hiçbir hastalık simptomsu gözlemlenmemiştir. F_1 'lerin kendilenmesiyle elde edilen F_2 'lerde ki açılım da X^2 (Khi-kare) testine göre hesaplanmıştır. Buna göre X^2 değeri 0.298 ($P=0.585$) olup, 3:1 D:H dağılımı hipotezi istatistiksel açıdan önemli bir sapma göstermemiştir. Bu sonuca göre dayanıklılık için açılımın 3:1 olduğu teyit edilmiştir. Benzer şekilde, BC1 bitkilerinin testleme sonrası X^2 değeri 1.64 ($P=0.199$) bulunmuş ve 1:1 dağılım hipotezinden önemli bir sapma göstermemiştir. Bu bulguların sonucunda dayanıklılığı ifade eden ve *Frl* olarak isimlendirilen genin tek ve tam dominant bir gen olduğu doğrulanmıştır.

4.2.Moleküler İşaretleyici Bulguları

4.2.1. SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism) Bulguları

Çalışmada kullanılan SRAP primer kombinasyonlarından elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2.'de görülmektedir. 247 SRAP primer kombinasyonu polimorfizm açısından ebeveynler ve bulk DNA'lar kullanılarak taranmıştır.

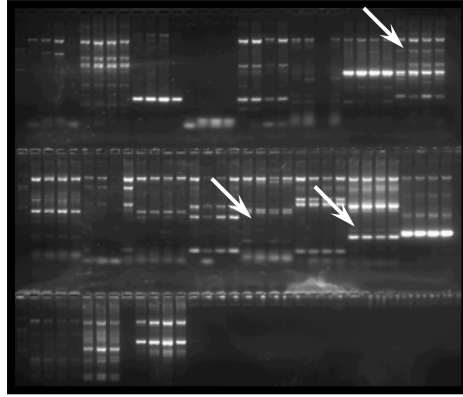
Çizelge 4.2. SRAP primer kombinasyonlarının PCR sonuçları

	Me1	Me2	Me3	Me4	Me5	Me6	Me7	Me8	Me9	Me10	Me11	Me12	Me13
Em1	+	-	+	-	+	+	-	+PP	-	+	+	+	+
Em2	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+PB	+	+	+
Em3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Em4	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-
Em5	+	+	+PP	+PP	+	+PB	-	-	-	+	+PP	+	-
Em6	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-
Em7	+	+PP	+	+PP	+PP	+	-	+	-	+	+	+PP	+
Em8	+	+PB	+PP	+	-	+	-	+	-	+PP	+	+PP	+
Em9	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+PP	+	+	-
Em10	+PP	+	+	+	+	+	-	+PP	-	+PP	+	+	+
Em11	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
Em12	+	-	+	-	+	+PP	-	+PP	-	+	+	-	+
Em13	+	+	+PP	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Em14	+	+PP	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
Em15	+	+	+PP	+	+	-	-	+PP	-	+PP	+PP	+	+
Em16	+PP	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
Em17	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Em18	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-
Em19	+	+	+	-	+	+	+	+PP	+	+	+	+	+

+ : PCR ürünü verdi
 - : PCR ürünü vermedi

PP: Ebeveynler arası polimorfizm
 PB: Bulklar arasında polimorfizm

247 SRAP primer kombinasyonundan 86 tanesinde PCR ürünü elde edilememiştir. PCR ürünü elde edilen 161 kombinasyonda ise dayanıklı-duyarlı ebeveynler ve dayanıklı- duyarlı bulklarda 644 DNA bandı elde edilmiştir. Ebeveynler arasında 25, bulklar arasında ise 3 polimorfizm elde edilmiş ancak hem ebeveynler hem de bulklar arasında bir polimorfizm görülmemiştir. Şekil 4.1’de SRAP kombinasyonlarından dayanıklı ebeveyn-dayanıklı bulk, hassas ebeveyn- hassas bulk sırasıyla me3 x em1-19 arası kombinasyonun oluşturduğu PCR ürünleri görülmektedir.



Şekil 4.1 me3-em19 arası RP, RB, SP, SB

4.2.2. SSR (Simple Sequence Repeat) Bulguları

Domatesin 9. kromozomunda yer alan SSR işaretleyicileri, SolGenomics Network’ten <http://www.sgn.cornell.edu> belirlenmiştir. Buna göre kromozom üzerinde sentromere yakın bölgeler baz alınarak, kromozomdaki yerleri 50.35 ve 61.00 arasındaki SSR işaretleyicileri

kullanılmıştır. Çalışmamızda domatesin 9. kromozomunda sentromere yakın bölgedeki 7 SSR işaretleyicisi dayanıklı-duyarlı ebeveyn ve bulklarında polimorfizm açısından test edilmiştir. Bu SSR işaretleyicilerinden iki tanesi (SSR 155 ve SSR 383) ebeveyn ve bulklarda PCR ürünü oluşturmamıştır (Çizelge 4.3). 5 adet SSR işaretleyicisinden de dayanıklı- duyarlı ebeveyn ve bulklarda toplam 18 DNA bandı elde edilmiştir. Ancak bu işaretleyiciler bakımından herhangi bir polimorfizme rastlanmamıştır.

Çizelge 4.3. SSR primerleri ile yapılan PCR sonuçları ve elde edilen band sayıları

Primerler	PCR sonuçları	Band Sayısı	Polimorfizm
SSR 19	+	4	-
SSR 28	+	4	-
SSR 155	-	-	-
SSR 110	+	3	-
SSR 99	+	4	-
SSR 237	+	3	-
SSR 383	-	-	-

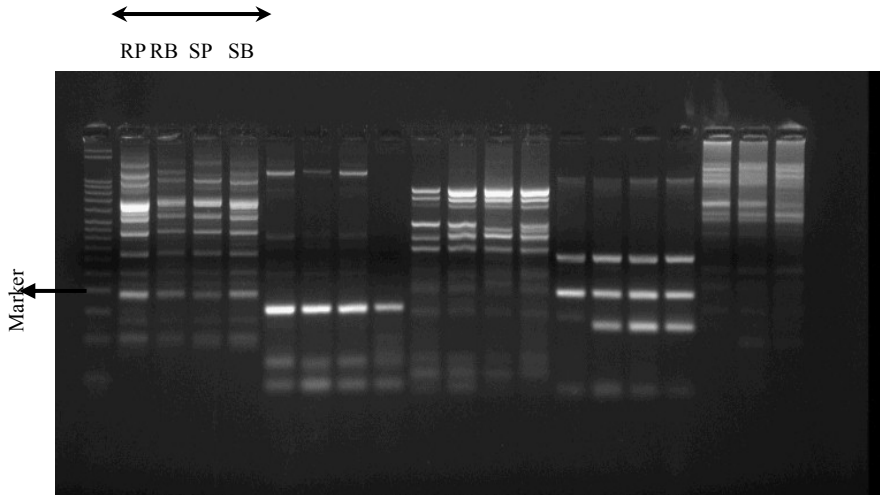
+ : PCR ürünü verdi

- : PCR ürünü vermedi ve polimorfizm yok

4.2.3. RGA (Resistance Gene Analogue) Bulguları

29 ileri ve 19 geri olmak üzere 419 RGA primer kombinasyonu denenmiştir (Mutlu vd, 2008). Çizelge 3.9'da RGA primerlerinin açık

isimleri yer almaktadır. 419 kombinasyonundan 85 tanesinde PCR ürünü elde edilememiştir (Çizelge 4.4) 334 RGA kombinasyonunda ise dayanıklı- duyarlı ebeveynler ile dayanıklı- duyarlı bulklarda 1336 DNA bandı elde edilmiştir. Ebeveynler arasında 23, bulklar arasında ise 6 polimorfizm görülmüş, ancak test edilen bu RGA kombinasyonlarından ebeveyn-bulk arasında polimorfizm belirlenememiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Dayanıklı Fla.7781, dayanıklı bulk, hassas 560 ve hassas bulk ile RGA(6-23, 25, 26, 28 ve 5-21 nolu kombinasyonlar) primerlerinin %2.5'lik agaroz jeldeki görüntüsü

Çizelge 4.4. RGA kombinasyonlarının PCR sonuçları

	5	6	7	8	11	12	15	16	17	18	20	22	24	27	29	30	31	32	33	34	35	36	39	40	43	46	
13	-	+	-	+	-	+	+	+PP	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
14	+	+	-	+PP	+PP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+PP	+	+	+	+PP	+	
19	+	+	-	-	+PP	+PB	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+PB	+	+	+PP	+	+	+	+	+	
21	+PP	+	-	+	+PB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	
25	-	+PB	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	
26	+	+PP	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+PP	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+PP	+	
28	+	+PP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+PP	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
37	-	+	+	-	+	-	-	+PP	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	
38	-	+	+	+	+	-	+	+	+PB	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
41	-	+	-	-	+	-	-	+PP	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
42	-	+PP	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+PP	+	+	-	+	
44	+	+	-	+PP	+	-	+	+PP	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+PP	+	+	-	+	
45	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
47	+	+	+	+PP	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+PP	+	+	-	+PP	
48	+	+	+	+	+PB	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	

+ : PCR ürünü verdi
 - : PCR ürünü vermedi

PP: Ebeveynler arası polimorfizm
 PB: Bulklar arasında polimorfizm

4.2.4. Conserved Ortholog Set II (Cos II) Bulguları

Domatesin 9. kromozomunda sentromere yakın bölgelerdeki (kromozom üzerindeki yerleri 52.0- 59.0 arası) Cos II işaretleyicileri Çizelge 4.5’de belirtilen primerler kullanılarak çoğaltılmış ve PCR ürünü 12 farklı enzim kesilmiştir. Kesim işleminde öncelikle dayanıklı ve duyarlı ebeveynler kullanılmış, elde edilen polimorfizm sonrasında bulklarına inilmiştir (Çizelge 4.5). 12 farklı enzim ile toplam 86 DNA bandı elde edilirken, ebeveynler arasında 12 polimorfizm görülmüştür.

Çizelge 4.5. Cos II işaretleyicileri ve 12 farklı enzim ile kesim sonrası PCR ve polimorfizm sonuçları

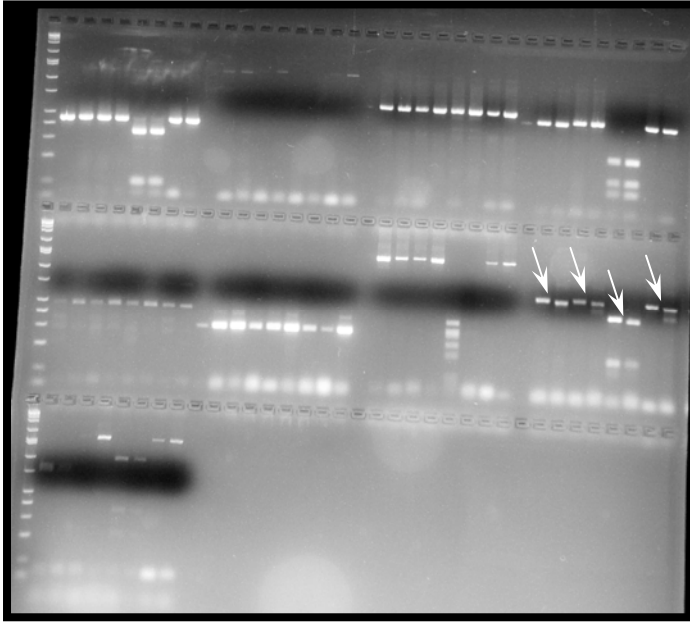
	Hin6I (HinP1I)	Dpn I	MaeI	Adel (DraIII)	TaqI	AsuII	RsaI	HhaI	NedI	VspI (Ase I)	Tru1I (MseI)	BsuRI (HaeIII)
C2_At2g29210	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C2_At1g03360	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2_At2g47890	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C2_At3g02680	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C2_At3g63190	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
C2_At3g48120	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+PP
C2_At1g02910	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
C2_At3g63200	+PP	+PP	+PP	+PP	+PP	+PP	+PP	+PP	+PP	+PP	-	+PP
C2_At4g02580	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-

+ : PCR ürünü verdi

- : PCR ürünü vermedi

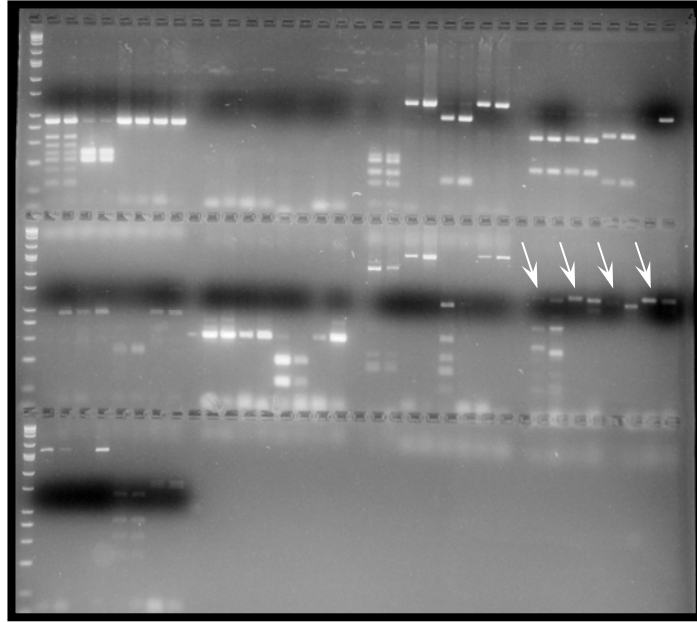
PP: Ebeveynler arası polimorfizm

Şekil 4.3’de C2_At2g29210, C2_At1g03360, C2_At2g47890, C2_At3g02680, C2_At3g63190, C2_At3g48120, C2_At1g02910, C2_At3g63200, C2_At4g02580 isimli 9 Cos işaretleyicisi ve Hin6I, Dpn I, MaeI, Ase I enzimleri ile kesim görüntüsü yer almaktadır. Jel üzerinde de işaretli olan C2_At3g63200 işaretleyicisinin Hin6I, Dpn I, MaeI, Ase I enzimleri ile kesimi; dayanıklı ve hassas ebeveynler arasında polimorfizm göstermiştir (Şekil 4.3).



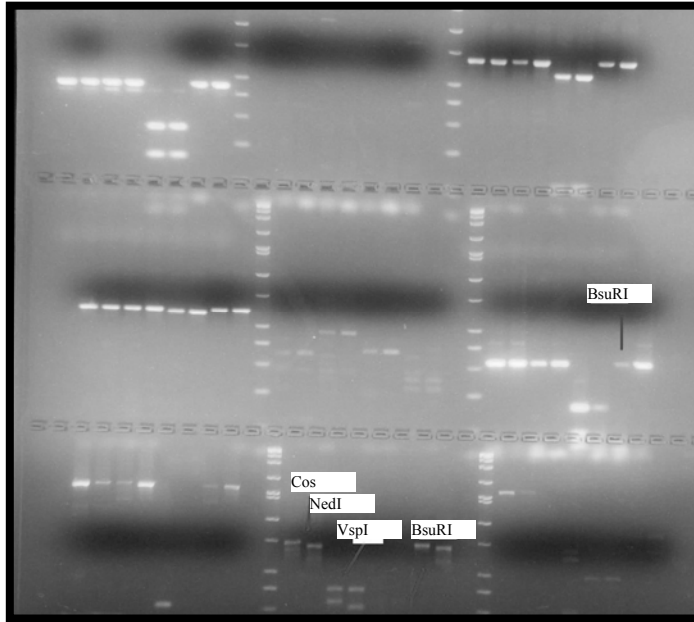
Şekil 4.3. C2_At2g29210, C2_At1g03360, C2_At2g47890, C2_At3g02680, C2_At3g63190, C2_At3g48120, C2_At1g02910, C2_At3g63200, C2_At4g02580 Cos II işaretleyicileri ve Hin6I, Dpn I, MaeI, Ase I enzimleri ile dayanıklı ‘Fla. 7781’ ve hassas ‘560’ ebeveynlerinin kesim görüntüsü.

Şekil 4.4'de C2_At2g29210, C2_At1g03360, C2_At2g47890, C2_At3g02680, C2_At3g63190, C2_At3g48120, C2_At1g02910, C2_At3g63200, C2_At4g02580 Cos işaretleyicileri ile TaqI, AsuII, RsaI, HhaI enzimleri ile kesim sonrası görüntüsü yer almaktadır. Dayanıklı ve duyarlı ebeveynler arasında C2_At3g63200 işaretleyicisi ile TaqI, AsuII, RsaI, HhaI enzimlerinin oluşturduğu farklılık, çalışmada umut verici olmuştur.



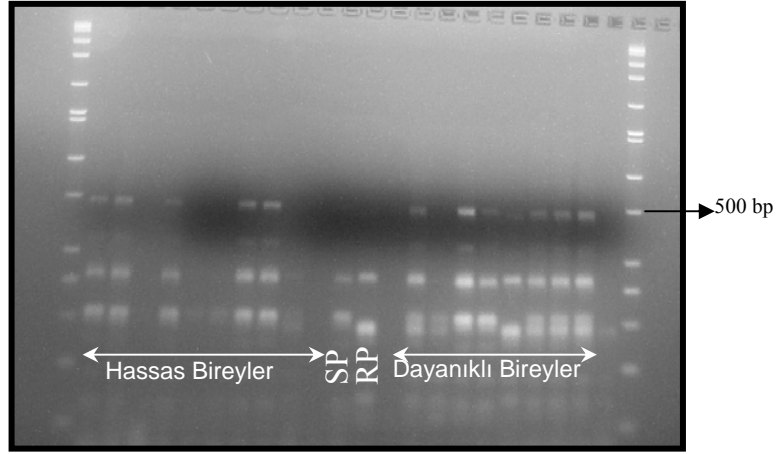
Şekil 4.4. C2_At2g29210, C2_At1g03360, C2_At2g47890, C2_At3g02680, C2_At3g63190, C2_At3g48120, C2_At1g02910, C2_At3g63200, C2_At4g02580 Cos II işaretleyicileri ve TaqI, AsuII, RsaI, HhaI enzimleri ile dayanıklı 'Fla. 7781' ve hassas '560' ebeveynlerinin kesim görüntüsü.

Şekil 4.5’de C2_At2g29210, C2_At1g03360, C2_At2g47890, C2_At3g02680, C2_At3g63190, C2_At3g48120, C2_At1g02910, C2_At3g63200, C2_At4g02580 Cos işaretleyicileri ile NedI, VspI, TruII, BsuRI enzimlerinin kesim görüntüsü yer almaktadır. C2_At3g63200 işaretleyicisi ile NedI, VspI, TruII, BsuRI enzimleri arasında ve C2_At3g48120 işaretleyicisi ile BsuRI arasında farklılık ortaya konmuştur.



Şekil 4.5 C2_At2g29210, C2_At1g03360, C2_At2g47890, C2_At3g02680, C2_At3g63190, C2_At3g48120, C2_At1g02910, C2_At3g63200, C2_At4g02580 Cos II işaretleyicileri ve NedI, VspI, TruII, BsuRI enzimleri ile dayanıklı ‘Fla. 7781’ ve hassas ‘560’ ebeveynlerinin kesim görüntüsü

C2_At3g63200 işaretleyicisi ile farklılık TaqI ve AsuII enzimleri ile ebeveynler ve bulklarla birlikte yeniden kesilmiştir. Şekil 4.6'da aynı işaretleyicinin TaqI enzimi ile kesim görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 4.6 C2_At3g63200 Cos II işaretleyicisi ile TaqI enziminin, 10 hassas ve 10 dayanıklı birey ile dayanıklı 'Fla. 7781' ve hassas '560' ebeveynlerinin kesim görüntüsü

4.2.4.1 Conserved Ortholog Set II (Cos II) ve SRAP Kombinasyon

Bulguları

Çalışmada kullanılan 9 Cos II işaretleyicisi SRAP işaretleyicileri ile kombine edilerek 576 kombinasyon oluşturulmuştur. Çizelge 4.6.a ve 4.6.b'de SRAP- Cos II kombinasyonu yer almaktadır. Çizelge 3.10'da CosII işaretleyicilerinin isimleri verilmektedir. Bu kombinasyonu

oluşturmanın nedeni; kromozom lokasyonu bilinen fakat ebeveynler arasında polimorfizm vermeyen COS işaretleyici lokuslarının COS-SRAP primerleri kullanılarak polimorfizm tespit edilmeye ve *Frl* geni ile olan ilişkisinin tespit edilmesi amalanmıştır.

Çizelge 4.6a. C2_At2g29210, C2_At1g03360, C2_At2g47890, C2_At3g02680, C2_At3g63190, C2_At3g48120, C2_At1g02910, C2_At3g63200, C2_At4g02580 ve SRAP kombinasyonlarının PCR sonuçları

	Em1	Em2	Em3	Em4	Em5	Em6	Em7	Em8	Em9	Em10	Em11	Em12	Em13	Em14	Em15	Em16	Em17	Em18
C1	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
C1	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
C2	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
C2	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
C3	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
C3	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
C4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
C4	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
C5	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C5	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
C6	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C6	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
C7	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
C7	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
C8	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
C8	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
C9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
C9	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

+ : PCR ürünü verdi

- : PCR ürünü vermedi

Çizelge 4.6b C2_At2g29210, C2_At1g03360, C2_At2g47890, C2_At3g02680, C2_At3g63190, C2_At3g48120, C2_At1g02910, C2_At3g63200, C2_At4g02580 ve SRAP kombinasyonlarının PCR sonuçları

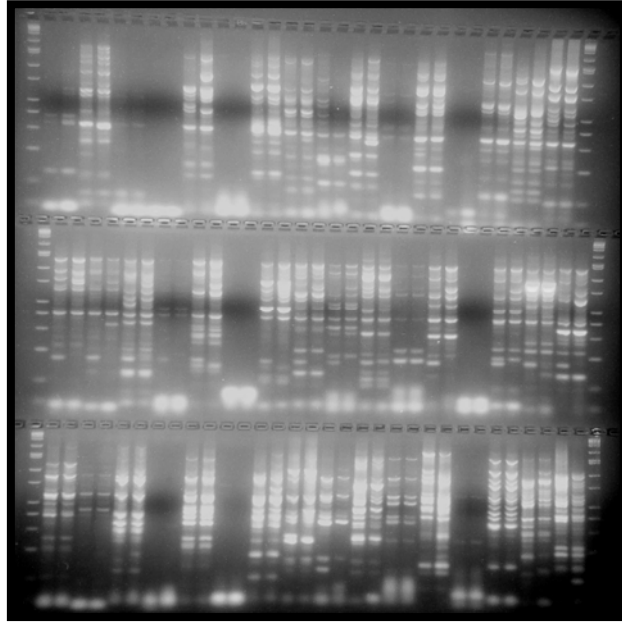
	Em19	Me1	Me2	Me3	Me4	Me5	Me6	Me7	Me8	Me9	Me10	Me11	Me12	Me13
C1 F	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-
C1 R	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
C2 F	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
C2 R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
C3 F	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
C3 R	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C4 F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C4 R	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
C5 F	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C5 R	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
C6 F	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
C6 R	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
C7 F	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
C7 R	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
C8 F	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
C8 R	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
C9 F	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
C9 R	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+

+ : PCR ürünü verdi

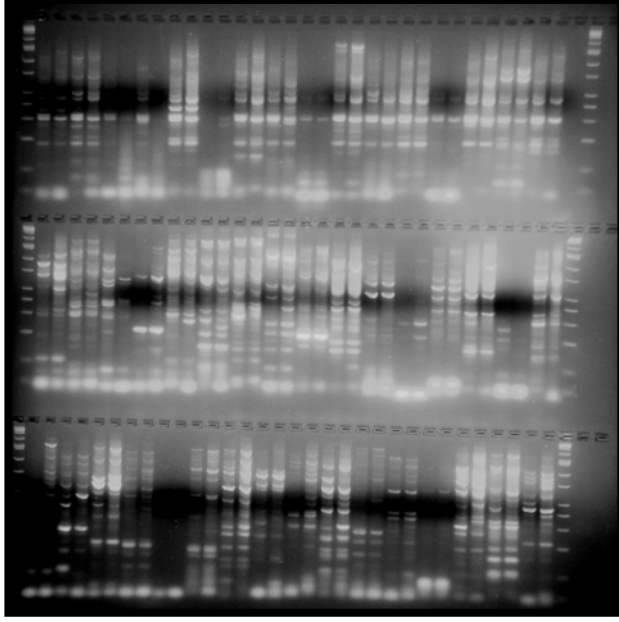
-: PCR ürünü vermedi

576 SRAP- Cos II kombinasyonun 117'sinden PCR ürünü elde edilememiştir. PCR ürünü oluşturan 459 kombinasyondan 918 DNA bandı (lokus) elde edilmiştir.

Şekil 4.7'de C2_At1g02910 (forward ve reverse), C2_At3g63200 (forward) CosII işaretleyicileri ile Em1-16 arasındaki kombinasyon görülmektedir.



Şekil 4.7 *Fusarium oxysporum f. sp. radicis lycopersici*'ye dayanıklı 'Fla. 7781' ve hassas '560' ebeveynler Cos II işaretleyicileri C2_At1g02910 (forward ve reverse), Cos II C2_At3g63200 (forward) ile SRAP primerleri Em1- Em16 arası kombine edilmiş, SRAP PCR şartları kullanılmıştır.



Şekil 4.8. *Fusarium oxysporum f. sp. radicis lycopersici*'ye dayanıklı 'Fla. 7781' ve hassas '560' ebeveynler Cos II işaretleyicileri C2_At3g63200 (reverse), C2_At4g02580 (forward ve reverse) ile SRAP primerleri Em1- Em16 arası kombine edilmiş, SRAP PCR şartları kullanılmıştır.

Şekil 4.8'deki jel resminde ise C2_At3g63200 (reverse), C2_At4g02580 (forward ve reverse) ile Em1-16 arasındaki kombinasyon görülmektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Fusarium oxysporum f.sp. radices lycopersici (FORL) önemli toprak kökenli patojen olup, verimde %20-60 oranında kayıplara neden olmaktadır (Omar et al., 2006). Hastalıkla mücadele de zirai teknikler, kimyasal uygulamalar, biyolojik ajanlar kullanılabilir. Ancak mücadelede %100 etkili ve en ekonomik yöntem dayanıklı çeşit kullanımıdır. Dayanıklı çeşit eldesinde moleküler işaretleyicilerin kullanılması ıslah programlarına hız kazandırmıştır.

Son dönemlerde moleküler yardımcı seleksiyon (MAS) tohum firmalarında rutin bir uygulama haline gelmiştir. Ancak ne yazık ki bu faaliyetlerin pek çoğu patentli ve yayınlanmamaktadır. Pek çok uluslararası tohum firması bu yolla ıslah programlarını yürütmektedirler (Foolad, 2007).

Domateste FORL ile ilgili ilk haritalama çalışması Fazio ve ark. (1999) tarafından yapılmıştır. 1000 RAPD işaretleyicisinden 3 tanesi (UBC116, UBC194, UBC655) *Frl* ile bağlantılı bulunmuştur. Bu RAPD işaretleyicilerinden *Frl*'ye en yakın uzaklıkta UBC194 işaretleyicisi bulunmuştur. *Frl*'ye 5.1 cM uzaklıkta belirlenen RAPD işaretleyicisinin mütehakip generasyonlarda devamlılığı sağlanmamış ve ıslahta kullanımı mümkün olamamıştır. Çünkü MAS amaçlı kullanılacak işaretleyicilerin 2cM ve altında olması istenir. Teorik olarak, 5 cM uzaktaki bir işaretleyicinin geriye melezleme çalışmalarında MAS (Moleküler Yardımlı Seleksiyon) amaçlı kullanılması durumunda $[V = 1-(1-p)^n]$ formülünden] beş geriye melez generasyonu sonunda $1-(1-0.005)^5=0.2262$, yani sözü geçen markırı taşıyan %22 hassas bitki birikmiş

olacaktır. Allard 1999 formülüne göre, ‘V’ gen ile marker arasındaki bağlantının kırılma oranını, ‘p’ rekombinasyon fraksiyonunu, ‘n’ geriye melez sayısını ifade etmektedir.

Çalışmada, hastalığa karşı dayanıklılık sağlayan *Frl* genine moleküler ıslahta kullanılabilecek yakınlıkta ve özellikle moleküler işaretleyicilerin geliştirilmesi ve ıslah çalışmalarında kullanılması hedeflenmiştir. Haritalama populasyonu için dayanıklı Fla. 7781 ve hassas 560 nolu hatlar melezlenerek F₁ populasyonu, F₁’lerin kendilenmesiyle F₂ populasyonu ve hassas ebeveyn ile geriye melezlenmesiyle de BC₁ populasyonu oluşturulmuştur. Haritalama populasyonları FORL izolatu ile testlenerek dayanıklılıkla ilişkili moleküler işaretleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Fusarium oxysporum f.sp. radicans lycopersici izolatu ile testlemeler sonucu, dayanıklılık geninin (*Frl*) kalıtımına bakıldığında, F₂ populasyonunda 3:1 açılımı elde edilmiştir. Vakalounakis de, (1988) *fusarium oxysporum f.sp. radicans lycopersici*’ye dayanıklı ‘IRB-301-31’ domates hattı ile hassas ‘Motelle’ ve ‘Earlypak’ çeşitlerini melezlemiş, F₁, F₂ ve BC₁ populasyonlarındaki testleme sonucunda F₂ bitkisindeki açılımın 3:1 oranında, BC₁’lerdeki açılımın 1:1 oranında olduğunu belirlemiştir. Testleme sonuçlarının da dayanıklılığın tek dominant gen tarafından idame ettirildiğini ortaya koymuştur. Çalışmamızdan elde edilen veriler Vakalounakis, (1988)’in bulgularıyla paralellik göstermiştir.

Haritalama çalışmalarında F₂ populasyonundaki 10 hassas ve 10 dayanıklı birey ile bulk segregant analizi (BSA) yapılmıştır (Michelmore

et al., 1991). Çalışmada kullanılan moleküler işaretleyiciler, oluşturulan bulklarda ve dayanıklı- hassas ebeveynlerde taranarak polimorfizm oluşturanlar belirlenmiştir.

Frl ile ilişkili haritalama çalışmasında SRAP işaretleyicisi (Li ve Quiros, 2001) RGA işaretleyicisi (Mutlu vd., 2008) dayanıklı- duyarlı ebeveyn ve bulklarda taranmıştır. Ayrıca SolGenomics Network'te (<http://www.sgn.cornell.edu>) belirtilen domates genetik haritalarından faydalanarak 9. kromozomda hem TG101 hem de *TM-2* allelline yakın bölgelerde bulunan SSR ve Cos II işaretleyicileri de kullanılmıştır. Nitekim, *Frl*'nin domateste 9. kromozomda yer aldığı ve RFLP işaretleyici 'TG101' ile ilişkili olduğu (> 10 cM) bildirilmiştir. Yine *Frl*'nin tütün mozaik virüsüne dayanıklılığı kontrol eden allel (*TM-2*) ile resesif *ah* (antosiyen oluşturmama) genine yakın yerde (> 5 cM) lokalize olduğu belirlenmiştir (Fazio et al., 1999; Vakalounakis et al., 1997).

Çalışmada test edilen 247 SRAP primerinden 161 kombinasyonda ebeveynler ve dayanıklı- duyarlı bulklarda 644 DNA bandı elde edilmiştir. SRAP işaretleyicileri birçok türde haritalama (Yeboah et al., 2007; Levi ve Thomas, 2007; Juan et al., 2001), gen işaretleme (Li and Quiros, 2001; Junsong et al., 2005; Mutlu vd., 2008), DNA parmak izi ve genetik akrabalık (Budak vd., 2004; Suman et al., 2008; Li et al., 2007; Gülşen vd., 2007; Ferriol et al., 2004; Han et al., 2007) çalışmalarında başarı ile kullanılmıştır. Mutlu vd., (2008) patlıcan'da *Fusarium* solgunluğuna (*Fusarium oxysporum* Schlecht.f. sp. *melongenae*) dayanıklılık için SRAP işaretleyicisi (Me8/Em5) kullanmış ve ıslah çalışmalarında markır yardımcı seleksiyonda kullanılabilir hale getirebilmek için SRAP işaretleyicilerini SCAR işaretleyicisine

dönüştürmüştür. Ancak çalışmamızda SRAP kombinasyonlarından hem ebeveynler hem de bulklar arasında bir polimorfizm elde edilememiştir

Domatesin 9. kromozomunda yer alan 7 SSR işaretleyicisi ile yapılan testleme sonucunda ebeveynler ve bulklarda 18 DNA bandı elde edilmiştir. SSR genetik haritalama çalışmalarında genetik çeşitliliğin belirlenmesinde pek çok bitki türünde örneğin, mısır (Senior and Heun, 1993), çeltik (Wu and Tanksley, 1993), arabidopsis (Bell and Decker, 1994) ve soya (Akaya vd., 1995)'da kullanılmaktadır. SSR işaretleyicileri spesifik genetik ilişki belirlemeye sahip (Tam et al., 2005) olmalarına rağmen çalışmamızda herhangi bir polimorfizme rastlanamamıştır.

Çalışmada kullanılan 419 RGA primer kombinasyonundan 334 'ü PCR ürünü vermiştir. Bu işaretleyicilerden ebeveynler ile dayanıklı-duyarlı bulklarda 1336 lokus elde edilmiştir. RGA primerlerinin kullanılmasındaki amaç *Frl* genine çok yakın bir işaretleyici tespit edebilmenin yanında genin kendisini veya çok yakın bir homologunu bulabilme ihtimalini değerlendirmek olmuştur.

Hemming et al., (2004), domateste *fusarium* solgunluğu olarak isimlendirilen *fusarium oxysporum f.sp.lycopersici* üzerine çalışmışlar, hastalığın 3. ırkına dayanıklılığı ifade eden *I-3* geninin haritalanması için SCAR, CAPS ve RGA işaretleyicilerini kullanarak, MAS için kullanılabilir çok yakın işaretleyiciler belirlemişlerdir. Ancak çalışmamızda kullanılan RGA işaretleyicileri ile herhangi bir polimorfizme rastlanamamıştır.

Domatesin 9. kromozomunda sentromere yakın bölgelerdeki C2_At2g29210, C2_At1g03360, C2_At2g47890, C2_At3g02680,

C2_At3g63190, C2_At3g48120, C2_At1g02910, C2_At3g63200, C2_At4g02580 isimli 9 Cos II işaretleyicileri çalışmada kullanılmıştır. Cos II işaretleyicileri 12 farklı enzimle kesilmiştir (Hin6I, Dpn I, MaeI, Ase I, TaqI, AsuII, RsaI, HhaI, NedI, VspI, TruII, BsuRI). Ebeveynlerde yapılan tarama sonucu C2_At3g63200 işaretleyicisi TruII hariç tüm enzimlerde polimorfizm vermiş, bulklara inildiğinde de TaqI enzimi ile polimorfizm elde edilmiştir. Bu C2_At3g63200 işaretleyicisi ve TaqI kombinasyonu bulkları oluşturan birey ve ebeveynlerde tekrarlanarak, polimorfizm varlığı ve *Frl* geni ile gösterdiği dağılım koralasyonu sınırlı sayıda F₂ ile belirlenmiştir.

9 Cos II işaretleyicisi, SRAP işaretleyicileri ile kombine edilerek 576 kombinasyon oluşturulmuş ve 918 DNA bandı (lokus) elde edilmiştir. Çalışmamızda en ümitvar sonuçlar Cos II işaretleyicileri ile ortaya konulmuştur. Bu işaretleyiciler ile AFLP, RFLP ve SSR işaretleyicileriyle tanımlanamayan bölgeler, daha hızlı bir şekilde haritalanabilmektedir (<http://www.sgn.cornell.edu>). Şu ana kadar domateste 300'den fazla Cos II işaretleyicisi haritalanmış ve gelecekte 500'ün üzerinde olacağı bildirilmektedir. Fulton et al., (2002) 1025 Cos işaretleyicisi tanımlamışlardır. Bu genlerin her iki genomunda tek bir kopyası olduğunu, domates ve arabidopsis gibi farklı genomlar arasında kıyaslamalı haritalama çalışmalarında kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Sonuç olarak çalışmada C2_At3g63200 işaretleyicisi ve TaqI enzimi kombinasyonunun *Frl* ile ilişkili olabileceği belirtilebilir. Çünkü 10 hassas ve 10 dayanıklı F₂ bitkisinde yapılan CAPS analizinde *Frl* genine bağlı ko-dominant bir işaretleyici oluşturmuştur. Ancak, bu ümitvar işaretleyicinin *Frl* genine olan uzaklığının belirlenmesi bundan

sonraki çalışmalarda 500 F₂ bitkisinde taranması ile mümkün olacaktır. Çünkü 500 F₂ bitkisi 1000 adet gamete denk geldiğinden bulunacak moleküler işaretleyici teorik olarak *Frl* genine $100/1000=0.1$ cM çözünürlüğü kadar yakın olabilecektir. Böylelikle bu işaretleyici ıslah programlarında kullanılarak *Frl*'ye dayanıklı domates çeşidi geliştirmesi hız kazanacaktır. Ayrıca bu çalışma domateste biyotik ve abiyotik strese ilişkili işaretleyici belirleme çalışmalarına ışık tutacaktır.

Bildiğimiz kadarıyla ülkemizde bu hastalığa karşı dayanıklı yerli domates çeşidi yoktur, araştırma sonucunda elde edilecek işaretleyicilerin yerli dayanıklı hibrit çeşit eldesini rutin hale getireceği, hız kazandıracığı ve dayanıklı yerli çeşitlerin pazar payını arttıracığı düşünülmektedir. Oluşturulacak bir ko-dominant CAPS işaretleyicisi dünyanın diğr bölgelerinde de FORL'ye dayanıklı çeşit geliştirmeyi kolaylaştıracak ve uluslararası firmaların tekelindeki *Frl* için işaretleyici yardımcı seleksiyonu tm ıslahıların kullanımına sunacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Agrios, G. N., 1988**, Plant Pathology, 3rd ed. Academic Pres, Inc., New York, pp 803.
- Akkaya, M. S., Bhagwat, A. A. and Creagan, P. B., 1992**, Length polymorphism of simple sequence repeat DNA in soybean, *Genetics*, 132: 1131-1139.
- Aldrich, J. and Cullis, C.A., 1993**, RAPD analysis in flax: optimization of yield and reproducibility using klentaq1 DNA polymerase, chelex 100 and gel purification of genomic DNA, *Plant Molecular Biology Reporter*, 11:128-141.
- Alexander, L. J. and Tucker, C. M., 1945**, Physiologic specialization in the tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*, *J Agric Res*, 70:303–313.
- Allard, R.W., 1999**. Principles of plant breeding, 2nd edn. Wiley, New York
- Anna, H., Mark, F., 2005**, A comparative study of srp, aflp, and ssr markers for detecting genetic differences among elite broccoli inbreds. *HortScience*. 40:998.
- Anonymous, 1998**, Plant Breeding and Genetics Newsletter, No:1, <http://www.fao.org/waicent/agricul.htm>.
- Anonymous, 2008**, Sol Genomics Network, www.cornell.edu.
- Areshchenkova, T. and Ganal, M. W., 1999**, Long tomato microsatellites are predominantly associated with centromeric regions, *Genome*, 42: 536–544.
- Armstrong, D.T., 1981**, Prostaglandins and follicular functions, *Pub Med.*, 62 (1): 283-91.

KAYNAKLAR (devam)

- Attitalla, H.I., Fatehi, J., Levenfors, J. And Brishammar, S., 2004,** A rapid molecular method for differentiating two special forms (lycopersici and radiceis lycopersici) of fusarium oxysporum, *Pol J Microbiol.*, 53:111-116.
- Barone, A., 2005,** Molecular Marker Asisted Selection for resistance to Pathogens in Tomato, Mas in Plants, Sension 1.
- Barone, A., Ercolano, M.R., Langella, R., Monti, L. and Frusciante, L., 2005.** Molecular marker-asisted selection for pyramiding resistance genes in tomato. *Adv. Hort. Sci.* 19:147-152.
- Behare, J., Laterrot, H., Saffatti, M. and Zamir, D., 1991,** Restriction fragment length polymorphism mapping of the stamp resistance gene in tomato, *Molecular Plant- Microbe Interactions*, 4(5):489-492.
- Bell, C.J. and Decker, J.R., 1994,** Assignment of 30 Microsatellite Loci to the Linkage Map of *Arapidopsis*, *Genomics*, 19: 137-144.
- Blancard, D., 2005.** Domates Hastalıkları Gözlem Teşhis Mücadele, (Ç. Abak, K. ve Sarı, N.), Hasad Yayıncılık, İstanbul.
- Bohn, G.W, and Tucker, C.M., 1939,** Immunity to fusarium wilt in the tomato. *Science* 89:603-604.
- Boyacı, H.F., 2007,** Patlıcanlarda *Fusarium* Solgunluğuna Dayanıklılık Kaynakları ve Dayanıklılığın Kalıtımı, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, (yayınlanmamış doktora tezi), ss 97, Adana.
- Budak, H., · Shearman, R. C., · Parmaksiz, I., · Gaussoin, R. E., · Riordan, T. P. and Dweikat, I., 2004,** Molecular characterization of Buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers, *Theor Appl Genet.*, 108:328-334.

KAYNAKLAR (devam)

- Can, C., Elekcioglu, H., Yücel, S. and Özaslan, M., 2003**, Seralarda domates fusarium solgunluğuna neden olan türlerin tanısı, hastalık oluşumunda nematodlar ile ilişkileri ve mücadele olanaklarının belirlenmesi. TUBİTAK TARP-2371 No'lu Proje.
- Can, C., Yucel, S., Korolev, N. and Katan, T., 2004**, First report of fusarium crown and root rot of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* in Turkey. *Plant Pathology* 53, 814.
- Cevri, H., 2008**, Rakamlarla Domates, Hasad Dergisi, (basım aşamasında).
- Chague, V., Mercier, J. C., Guenard, M., Courcel, A. and Vedel, F., 1997**, Identification of RAPD markers linked to a locus involved in quantitative resistance to TYLCV in tomato by bulked segregant analysis, *Theor Appl Genet*, 95 : 671-677.
- Chunwongse, J., Chunwongse, C., Black, L. and Hanson, P. 1998**, Mapping of the *Ph-3* gene for late blight from *L. pimpinellifolium* L 3708, Report of the Tomato Genetics Cooperative, Number 48-December, Dept of Plant Breeding, Cornell University.
- Coaker, G. L. and Francis, D.M, 2004**, Mapping, genetic effects, and epistatic interaction of two bacterial canker resistance QTLs from *Lycopersicon hirsutum*, *Theoretical and Applied Genetics*, 108(6):1047-1055.
- Collins, N., Park, R., Spielmeier, W., Ellis, J. and Pryor, A.J., 2001**, Resistance gene analogs in barley and their relationship to rust resistance genes, *Genome*, 44: 375-381.
- Czembor, P. C. and Czembor, J. H., 2004**, The use of bulk segregant analysis to identify a RAPD marker linked to the *Mla* locus of barley, *Plant Breeding and Seed Science*, 49:41-49.

KAYNAKLAR (devam)

- Danesh, D., Aarons, S., McGill, E. G. and Young, D. N., 1994,** Genetics dissection of oligogenic resistance to bacterial wilt in tomato, *Molecular Plant- Microbe Interactions*, 7(4):464-471.
- Datnoff, L. E. and Pernezny, K. L., 2001,** *Paenibacillus macerans* and *Trichoderma harzianum* enhance transplant growth and suppress fusarium crown and root rot in Florida tomato production, 2001 Caribbean Division Meeting Abstracts, La Habana, Cuba. Publication No. P- 2002-0025-CRA.
- Dax, E., Livneh, O., Aliskevicius, E., Edelbaum, O., Kedar, N., Gavish, N., Milo, J., Geffen, F., Blumenthal, A., Rabinowich, H. D. and Sela, I., 1998,** A SCAR marker linked to the ToMV resistance gene, *Tm22*, in tomato, *Euphytica*, 101: 73–77.
- Dayteg, C., Tuveesson, S., Merker, A., Jahoor, A. and Kolodinska, B. A., 2007,** Automation of DNA marker analysis for molecular breeding in crops: practical experience of a plant breeding company, *Plant Breeding*, 126, 410-415.
- Dickinson, M. J., Jones, D. A. and Jones, J. D., 1993,** Close linkage between the Cf-2/Cf-5 and Mi resistance loci in tomato, *Mol Plant Microbe Interact*, 6(3):341-347.
- Diwan, N., Fluhr, R., Eshed, Y., Zamir, D. and Tanksley, S. D., 1999,** Mapping of Ve in tomato : A gene conferring resistance to the broad-spectrum pathogen, *Verticillium dahliae* race 1, *Theoretical and Applied Genetics*, 98(2):315-319.
- Doganlar, S., Dodson, J., Gabor, B., Beck-Bunn, T., Crossman, C. and Tanksley, S. D., 1998,** Molecular mapping of the py-1 gene for resistance to corky root rot (*Pyrenochaetalycopersici*) in tomato, *Theoretical and Applied Genetics*, 97(5-6):784-788.

KAYNAKLAR (devam)

- Dondini L., Costa F., Pierantoni L., Gaiotti F., Chiodini R., Tartarini S. and Sansavini S., 2004**, The RGA family. Promising gene analog related to fireblight and Sharka resistance in pear and apricot. Eucarpia Symposium in fruit breeding and genetics, 1-5 Sept. 2003, Angers, France ISHS. Acta Hort. 663: 161-165.
- Eleuch, L., Jilal, A., Grando, S., Ceccarelli, S., Schmising, M. K., Hajer, A., Daaloul A. and Baum M., 2008**, Genetic diversity and association analysis for salinity tolerance of barley germplasm using simple sequence repeat markers, *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(8):1004 – 1014.
- Esposito, M. A., Milanese, L., Martin, E., Cravero, V., Lopez, F., Anido, S. and COUNTRY, E., 2007**, Augmenting the genetic base in pea (*Pisum sativum* L.), *Biotechnology*, 6(4):573-577.
- FAO, 2006**, Statistical database of food and agriculture organization of the United Nations, <http://faostat.fao.org/faostat/>.
- Farley, J. D., 1975**, Identified : new tomato root and crown rot disease, *Am. Veg. Grower*, 23(10): 30.
- Fazio, G., Stevens, M and Scott, J. W., 1999**, Identification of RAPD markers linked to fusarium crown and root rot resistance (Frl) in tomato, *Euphytica*, 105: 205-210.
- Ferriol, M., Pico, B., Cordova, P. F., and Nuez, F., 2004**, Molecular diversity of a germplasm collection of squash (*cucurbita moschata*) determined by SRAP and AFLP markers, *Crop Science Society of America*, 44:653–664.
- Foolad, M. R., 2007**, Genome Mapping and Molecular Breeding of Tomato. *International Journal of Plant Genomics* Volume 2007, Article ID 64358.

KAYNAKLAR (devam)

- Frey, J. E., Frey, B., Sauer, C. and Kellerhals, M., 2008,** Efficient low-cost DNA extraction and multiplex fluorescent PCR method for marker-assisted selection in breeding, *Plant Breeding*, 123(6): 554-557.
- Fulton, M. T., Rutger V. H., Nancy T. Eannetta, and Steven D. Tanksley. 2002,** Identification, analysis, and utilization of conserved ortholog set markers for comparative genomics in higher plants, *The Plant Cell*, 14:1457–1467.
- Gasco, M. M. and Díaz, R. M., 2003,** Development of a specific polymerase chain reaction-based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and Its Pathogenic Races 0, 1A, 5, and 6, *Phytopathology*, 93(2):200-209.
- Giovanni, C., Dell’Orco^a, P., Bruno, A., Ciccarese, F., Lotti, C. and Ricciardi, L., 2004,** Identification of PCR-based markers (RAPD, AFLP) linked to a novel powdery mildew resistance gene (*ol-2*) in tomato, *Plant Science*, 166(1): 41-48.
- Gonsalves, A. K. and Ferreira S. A., 1993,** *Fusarium oxysporum*, Crop Knowledge Master.
- Gordon, T. R., Okomato D. and Jacobson, D. J., 1989,** Colonization of muskmelon and nonsusceptible crops by *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* and other species of *Fusarium*. *Phytopathology*, 79:1095-1100.
- Grattidge, R. and O’Brien, R. G., 1982.,** Occurrence of a third race of *Fusarium* wilt of tomatoes in Queensland. *Plant Dis.*, 66:165– 166.
- Gulsen, O., Karagül, S. and Abak, K., 2007,** Diversity and relationships among Turkish okra germplasm by SRAP and phenotypic marker polymorphism, *J. Biologia Bratislava*, 62, 41-45.

KAYNAKLAR (devam)

- Guo, P. G., Bai, G. H., Li, R. H., Shaner, G. and Baum, M., 2006,** Resistance gene analogs associated with Fusarium head blight resistance in wheat, *Euphytica*, 151:251–261.
- Gülistan, E., 2006,** Tarımsal Ürünlerde Üretim-Fiyat İlişkisinin Koyck Yaklaşımı İle Analizi (Domates Örneği) Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, 23(2):17-24., Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tokat.
- Gülşen, O. ve Mutlu, N., 2005.** Bitki Biliminde Genetik Markırlar ve Kullanım Alanları. Alatarım, 4 (2): 27-37.
- Han, J. M., Hou X. L., Xu, H. M., Shi, G. J., Geng, J. F. and Deng, X. H., 2007,** Genetic differentiation of non-heading chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino) germplasm based on SRAP markers, *Acta Agronomica Sinica*, 33 (11): 1862-1868.
- He, C., Poysa, V. and Yu, K., 2003,** Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in determining relationships among *Lycopersicon esculentum* cultivars, *Theoretical and Applied Genetics*, 106:363-73.
- Hemming, M., Basuki, S., McGrath, D., Carroll, B. and Jones, D., 2004,** Fine mapping of the tomato *I-3* gene for fusarium wilt resistance and elimination of a co-segregating resistance gene analogue as a candidate for *I-3*, *Theoretical and Applied Genetics*, 109(2): 409-418.
- Hernandez, P., 2004,** Development and use of genomic tools for cereal introversion breeding. In: J. Vollmann, H. Grausgruber, P. Ruckebauer (eds), *Genetic Variation for Plant Breeding*, 49—51. Eucarpia & Boku, Vienna, Austria.

KAYNAKLAR (devam)

- Hibar, K., Remadi, M., Khiareddine, H., and Mahjoub, M., 2006,** Control of fusarium crown and root rot of tomato, caused by fusarium oxysporum f. sp. radicis lycopersic, by grafting onto resistant rootstocks, *Plant Pathology Journal*, 5(2) : 161-165.
- Hong Li, T.,- Li, Y.-X., Li., Z.-C., -Liang Zhang, H., Qi Y.-W. and Wang T., 2008,** Simple sequence repeat analysis of genetic diversity in primary core collection of peach (*Prunus persica*), *J Integr Plant Bio.*, 50 (1):102-110.
- Hori, K., Sato, K., Kobayashi, T. and Takeda, K., 2006.** QTL Analysis of Fusarium Head Blight Severity in Recombinant Inbred Population Derived from a Cross between Two-rowed Barley Varieties, *Breeding Science*, 56(1), 25-30.
- Hospital, F., 2003,** Marker-assisted Breeding. In: H. J. Newbury (ed.), *Plant Molecular Breeding*, 30-59. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
- Hua Qing, P., Hu, Z. D., Tanisaka, T. and Wang, L., 2003,** Fine mapping of the blast resistance gene pi15, linked to pii, on rice chromosome 9, *Acta Botanica Sinica*, 45(7).
- Huang, S., Edwin A. G., Kuang, H., Vivianne, G. A. A., Zhang, N., Theo, J. A., Herman, J., Baker, B., Jacobsen, E. and Richard, G.F., 2005,** Comparative genomics enabled the isolation of the R3a late blight resistance gene in potato, *The Plant Journal* , 42,:251–261.
- Hung Lin, K., Hsiao-Feng, L., Shao-Pei, L., George, C. K., Jen-Tzu C. and Wei-Lun, Y., 2006,** RAPD markers for the identification of yield traits in tomatoes under heat stress via bulked segregant analysis *Hereditas*, 143(2006):142-154.

KAYNAKLAR (devam)

- Jarvis, W. R. and Thorpe, H. J. 1981**, Control of Fusarium foot and root rot by soil amendment with lettuce residues, *Can. J. Plant Pathol.*, 3: 159-162.
- Jermstad, K. D., Sheppard, L. A., Kinloch, B. B., Delfino-Mix, A., Ersoz, E. S., Krutovsky K. V. and Neale, D. B., 2006**, Isolation of a full-length CC–NBS–LRR resistance gene analog candidate from sugar pine showing low nucleotide diversity, *Tree Genetics & Genomes*, 2: 76–85.
- Ji, Y. and Scott, J. W., 2006**, *Ty-3*, a begomovirus resistance locus linked to *Ty-1* on chromosome 6. Rept, *Tomato Genetics Coop.*, 56:22-25.
- Jones, J. B., Jones, J. P., Stall, R. E. and Zitter, T. A., 1991**, Compendium of tomato diseases, *American Phytopathological Society*, St. Paul, MN.
- Juan, J. R., Pico, B., Li, G., D'Antonio, V., Falk, B. and Quiros C. F., 2001**, Identification of markers linked to a celery mosaic, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 126(4):432–435.
- Jung Kim, H., Jae-hyeong, Y., Hwa-Jin, C., Jung-Heon H., Byung-Dong, K., 2007**, Development Of AFLP And SCAR Markers Linked To The L^4 Locus For Resistance To TMV In Pepper Plant & Animal Genomes XV Conference January 13-17, 2007 Town & Country Convention Center San Diego, CA.
- Junsong, P., Wang, G., Li, X., He, H., Wu, A. and Cai, R., 2005**, Construction of a cucumber genetic linkage map with SRAP markers and location of the genes for lateral branch train, *Sci China C Life Sci.*, 48(3):213-20.

KAYNAKLAR (devam)

- Kanazin, V., Marek, L. F., And Randy C. S.,1996**, Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 11746-11750.
- Kang, B. C., Yeam, I. and Jahn, M. M., 2005**, Genetics of plant virus resistance, *Annu. Rev. Phytopathol.*,43: 581-621.
- Katan, T. and Katan, J., 1999**, Vegetative Compatibility Grouping in *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* from the UK, the Netherlands, Belgium and France, *Plant Pathology*, 48:541-549
- Katan, T., Shlevin, E., and Katan, J., 1997**, Sporulation of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* on stem surfaces of tomato plants, and aerial dissemination of inoculum, *Phytopathology*, 87:712-719.
- Katzir, N., Danin-Poleg, Y., Tzuri, G., Karchi, Z., Lavi, U. and Cregan, P. B., 1996**, Length Polymorphism and Homologies of Microsatellites in Several Cucurbitaceae Species, *Theor. Appl. Genet.*, 93, 1282-1290.
- Kawchuk, L. M., Hachey, J. and Lynch, D.R., 1998**, Development of sequence characterized DNA markers linked to a dominant verticillium wilt resistance gene in tomato, *Genome*, 41: 91-95.
- Kistler, H.C., Alabouvette, C., Baayen, R. P., Bently, S., Brayford, D., Coddington, A., Correl, J., Daboussi, M. J., Elias,K., Fernandez, D., Gordon, T. R., Katan, T., Kim, H. G., Leshe, J. F., Martyn, R. D., Migheli, Q., Moore, N. Y., O'Donnell, K., Ploetz, R. C., Rutherford, M. A., Summerell, B., Waalwijk, C. and Woo, S. 1988**, Systematic numbering of vegetative compatibility groups in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 88(1):30-32.

KAYNAKLAR (devam)

- Korolev, N., Katan, J. and Katan, T., 2000**, Vegetative compatibility groups of *verticillium dahliae* in Israel: their distribution and association with pathogenicity, *Ecology and Population Biology*, 90(5): 529-536.
- Kun-Pu, Z., Liang, Z., Ji-Chun T., Guang-Feng, C., Xiao-Ling, J. and Bin, L., 2008**, A genetic map constructed using a doubled haploid population derived from two elite Chinese common wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties, *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(8): 941 – 950.
- Laterrot, H. and Moretti, A., 1991**, Allelism of Various FORL Resistance Sources. *Rep Tomato Genet Coop* 41:28-30.
- Levi, A. and Thomas, C.E., 2007**, Rapid, ISSR and AFLP markers representing various linkage regions of a watermelon genetic map are polymorphic among closely related watermelon cultivars, *HortScience*, 42:210-214.
- Li, Chao H., Hai-Jian, Z., Jun-Yi, G., Dong-Quan, G., Yan-Wei, W., Kai L, Li B. and Yang H., 2006**. Inheritance and Gene Mapping of Resistance to Soybean Mosaic Virus Strain SC14 in Soybean, *Journal of Integrative Plant Biology*, 48(12). 1466-1472.
- Li, G. and Quiros, C. F., 2001**, Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica, *Theor Appl Genet.*, 103:455–461.
- Li, Y., Shen, J., Wang, T. , Chen, Q. , Zhang, X., Fu, T., Meng, J. , Tu, J. and Ma, C., 2007**, QTL analysis of yield-related traits and their association with functional markers in (*Brassica napus* L.), *Australian Journal of Agricultural Research*, 58(8):759-766.

KAYNAKLAR (devam)

- Lu, Y. Q. and Wu, W. R., 2006**, Identification of salt-responsive genes in English cordgrass (*Spartina anglica*) roots using SRAP technique, *Journal of Zhejiang University(Agriculture & Life Science*, 32(5): 511-514, (in Chinese with English abstract).
- Malhotra, S. K. and Vashistha, R. N., 1993**, Genetics of resistance to Fusarium wilt race 1 in currant tomato (*Lycopersicon pimpinellifolium*), *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 63(4):246-247.
- Mammadov , J. A., Liu, Z., Biyashev , R. M., Muehlbauer G. J. and Saghai Maroof M. A., 2006**, Cloning, genetic and physical mapping of resistance gene analogs in barley (*Hordeum vulgare* L.), *Plant Breeding*, 125, 32-42.
- Maoqing, W. U., Daohua, H.E., Yichun N. I. E., Xianlong, Z, and Zhongxu, L., 2003**, Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP, *Chinese Science Bulletin -English Edition*, 48(19):2063-2067.
- Martinez, S.G., Andreani, L., Gusano, G.M., Geuna, F. and Ruiz, J.J., 2006**, Evaluation of amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeats for tomato germplasm fingerprinting: utility for grouping closely related traditional cultivars, *Genome*, 49:648-656.
- McGrath, D. J., Gillespie, D. and Vawdrey, L., 1987**, Inheritance of resistance to Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici races 2 and 3 in *Lycopersicon pennellii*, *Aust J Agric Res.*, 38:729-733.
- Michelmore, R.W., Paran, and Kesseli R. V., 1991**, Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88:9828-9832.

KAYNAKLAR (devam)

- Miller, A.S., Rowe, C.R., Riedel, M.R., 1996,** *Fusarium* and *Verticillium* wilts of tomato, potato, pepper and eggplant. The Ohio State University Extension Plant Pathology, HGY-3122-96. 2021 Cofey Road. Columbus, OH 43210108
- Moury, B., Pflieger, S., Blattes, A., Lefebvre, V. and Palloix A., 2000,** A CAPS marker to assist selection of tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance in pepper, *Genome*, 43: 137–142.
- Mutlu, N., Boyacı, F. H., Göçmen, M. and Abak, K., 2008,** Development of SRAP, SRAP-RGA, RAPD and SCAR markers linked with a *Fusarium* wilt resistance gene in eggplant, *Theor Appl Genet.*, DOI 10.1007/s00122-008-0864-6 (in press).
- Ohmori , T., Murata, M. and Motoyoshi, F., 1996,** Molecular characterization of RAPD and SCAR markers linked to the *Tin-1* locus in tomato, *Theor Appl Genet.*, 92:151-156
- Ohmori , T., Murata, M. and Motoyoshi, F., 2000,** Molecular characterization of the SCAR markers tightly linked to the Tm-2 locus of the genus *Lycopersicon*, *Theor Appl Genet.*, 101:64–69 .
- Omar, I., O’Neill, T. M. and Rossall, S., 2006,** Biological control of fusarium crown and root rot of tomato with antagonistic bacteria and integrated control when combined with the fungicide carbendazim, *Plant Pathology*, 55, 92–99.
- Ozbay, N. And Newman, S., 2004,** *Fusarium* crown and root rot of tomato and control methods. *Plant Pathology Journal*, 3(1): 9-18.
- Önal, S., 2006,** Identification of Resistance Gene Analogs Epressed in the absence of Pathogen in Tall Fescue and BermudaGrass, Graduate School of Engineering and Natural Science, Sabancı University (Master Thesis), pp 64.

KAYNAKLAR (devam)

- Özalp.,R ve Aktaş., A., 2008,** Ülkemizde ve Antalya da sebzeçiliğın genel durumu, *Tarımın Sesi*, Ziraat Mühendisleri Odası Yayınlar, 12-16.
- Özer, N. And Soran, H., 1991,** *Fusarium* Genus and *Fusarium* species isolated from the cultivated plants in Turkey. *J. Turk. Phytopath.*, 20(2-3):69-80.
- Poleg Danin, Y., Reis, N., Baudracco-Arnas, S., Pitrat, M., Staub, J. E., Oliver, M., Arus., Devicente, C. M. and Katzir, N., 2000,** Simple Sequence Repeats in *Cucumis* Mapping and Map Merging, *Genome*, 43: 963–974.
- Poleg Danin, Y., Reis, Tzuri, G. and Katzir, N., 2001,** Development and characterization of microsatellite markers in *Cucumis*, *Theor Appl Genet.*, 102:61–72.
- Preetha, S., and Raveendren T. S., 2008,** Molecular marker technology in cotton, *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 3(2):032-045.
- Primo, P., Cartia, G. and Katan, T., 2001,** Vegetative Compatibility and heterokaryon stability in *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* from Italy, *Plant Pathology*, 50:371-382.
- Qian, W. C., Zhang, GH, Chen, F. X., Han, Y. K., Chen, D. F., Du, S. L. and Chen, X. W., 2006,** Characteristics of SRAP marker in detecting polymorphism of cucumber genome, *PubMed*, (28):11:1435-1439.
- Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1993,** Genetic Diagnosis in Plant Breeding: RAPDs, Microsatellites and Machines, *Trends Genet.*, 9: 275-280.

KAYNAKLAR (devam)

- Rahman, M., McVetty, P.B.E. and Li, G., 2007**, Development of SRAP, SNP and multiplexed SCAR molecular markers for the major seed coat color gene in (*Brassica rapa* L.), *Theoretical And Applied Genetics*, 115(8):1101-1107.
- Rajput, S.G., Wable, K.J., Sharma, K.M., Kubde, P.D. and Mulay, S.A., 2006**, Reproducibility testing of RAPD and SSR markers in Tomato, *African Journal of Biotechnology*, 5 (2):108-112.
- Roberts, P. D., McGovern, R. J. and Datnoff, L.E., 2000**, Fusarium Crown and Root Rot of Tomato in Florida. *Plant Pathology* Fact Sheet.
- Rowe, R. C., Farley, J. D. and Coplin, D. L., 1977**, Airborne spore dispersal and recolonization of steamed soil by *Fusarium oxysporum* in tomato greenhouses, *Phytopathol.*, 67: 1513-1517.
- Sandbrink, J. M., Van Ooijen, J. W., Purimahua, C. C., Vrieling, M., Verkerk, R., Zabel, P. and Lindhout, P., 1995**, Localization of genes for bacterial canker resistance in *Lycopersicon peruvianum* using RFLPs, *Theoretical and Applied Genetics*, 90(3):444-450.
- Scott, J. W. and Jones, J. P., 1989**, Monogenic resistance in tomato to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3, *Euphytica*, 40:49-53.
- Scott, J. W. and Jones, J. P., 2000**, Fla. 7775 and Fla. 7781: tomato breeding lines resistant to fusarium crown and root rot, *Hort Science*, 35 (6): 1183-1184.
- Scott, J. W., 2005**, Perspective on Tomato Disease Resistance Breeding: Past, Present and Future. *Acta Hort* 695.
- Scott, J. W., and Farley, D. J., 1981**, Evaluation of fusarium crown and root rot resistant greenhouse tomatoes. *Ohio agric. Res. Dev. Cent. Res. Circ.*, 264:16-17.

KAYNAKLAR (devam)

- Senior, M. L., and Heun, M. 1993**, Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer, *Genome*, 36: 884–889.
- Sevgican A., 1999**. Örtüaltı sebzeçiliği, topraklı tarım (Cilt-1), Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No:528, Bornova-İzmir, ss 287.
- Shashidar, H. E., Vinod, M. S., Sudhir, G., Naveen, S. V. and Krishnamurthy K., 2005**, Markers linked to grain yield using bulked segregant analysis approach in rice (*Oryza sativa* L.), *Rice Genetics Newsletter*, 22(1):73-75.
- Sherf, A. F. and Machab, A. A., 1986**, Vegetable Diseases and Their Control, Second Edition. pp 736.
- Singleton, L. L., Mihail, J. D., Rush, C. M., 1992**, Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi, 115-128. APS PRESS. St. Paul Minnesota.
- Smutkupt, S., Peyachoknagul, S., Kowitwanich, K., Onto, S., Thanananta, N., Julsrigival, S., Kunkaew, W. and Punsupa, V., 2006**, Varietal determination and genetic relationship analysis of highland legumes using SRAP markers, *Journal of Breeding and Genetics*, 38(1) 19-27.
- Stall, R.E. and Walter, J.M., 1965**, Selection and inheritance of resistance in tomato to isolates of race 1 and 2 of the fusarium wilt organism. *Phytopathology* 55, 1213–1215.
- Staniaszek, M., Kozik E. U. and Marczewski, W., 2007**, A CAPS marker TAO1902 diagnostic for the I-2 gene conferring resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 in tomato, *Plant Breeding*, 126, 331–333.

KAYNAKLAR (devam)

- Stevens, M. R., Lamb, E. M. and Rhoads, D. D., 1995**, Mapping the Sw-5 locus for tomato spotted wilt virus resistance in tomatoes using RAPD and RFLP analyses, *Theor. Appl. Genet.*, 90: 451-456.
- Stommel, J. R. and Zhang, Y., 2001**, Inheritance and qtl analysis of anthracnose resistance in the cultivated tomato (*lycopersicon esculentum*), VII International Symposium on the Processing Tomato, August 2001, Sacramento, USA.
- Suman, A., Kimbeng, C., Edme, S. J. and Veremis, J. C., 2008**, Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) markers for assessing interrelationships and genetic diversity among members of the Saccharum complex, *Diversity Plant Genetic Resources*, 6:1-10
- Summerel, B.A., Leslie, J. F., Backhouse, D., Bryden, W. L. and Burgess, L.W., 2001**, *Fusarium*, Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press, St. Paul, Minnesota, p.190-192.
- Tam, S. M., Mhiri, C., Vogelaar, A., Kerkveld, M., Pearce, S.R and Grandbastien, M. A., 2005**, Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR. *Theor Appl Genet.*, 110(5):819-831.
- Tian-Hong, L., Yin-Xia, L., Zi-Chao, L., Hong-Liang, Z., Yong-Wen, Q. and Tao W., 2008**, Simple sequence repeat analysis of genetic diversity in primary core collection of peach (*prunus persica*), *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(1), 102-110.
- TUİK, 2006.**, Türkiye İstatistik Kurumu www.tuik.gov.tr

KAYNAKLAR (devam)

- Vakalounakis, D. J., Laterrot, H., Moretti, A., Ligoxiakís, E. K. and Smardas, K., 1997**, Linkage between *Fr1* (*Fusarium oxysporium* f. sp. *radicis-lycopersici* resistance) and *Tm-2* (tobacco mosaic virus resistance-2) loci in tomato (*Lycopersicon esculentum*), *Ann. Appl. Biol.* 130:319-323.
- Vakalounakis, D.J., 1988**, The genetic analysis of resistance to fusarium crown and root rot of tomato. *Plant Pathology* 37, 71-73.
- Vakalounakis, D. J. and Fragkiadakis, G. A. 1999**, Genetic diversity of *fusarium oxysporum* isolates from cucumber: differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility, and RAPD fingerprinting, *Ecology and Population Biology*, 89(2) 161-168.
- Vincent, J. M., Marilyn, A. L., Inai, S., Caines, A., Arntzen, L., Jodee, K., and St.Clair, D. A., 2001**, Marker-assisted introgression of blackmold resistance QTL alleles from wild *Lycopersicon cheesmanii* to cultivated tomato (*L. esculentum*) and evaluation of QTL phenotypic effects, *Molecular Breeding*, 8(3): 217-233.
- Volin, R.B. and Jones, J. P., 1982.**, A new race of *Fusarium* wilt of tomato in Florida and sources of resistance. *Proc Fla State Hortic Soc.*, 95:268–270.
- Wen, Y, C., Wang, H, Z. and Shen., J. X., 2006**, Comparison of cultivar fingerprints constructed with SRAP and SSR markers in *Brassica napus* L *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, (28):3, 233-239.
- Williams, C. E., Wielgus, S. M., Haberlach, G.T., Guenther, C., Kim-Lee, H. and Hegelson, J.P., 1993**, RFLP analysis of chromosomal segregation in progeny from an interspecific hexaploid somatic hybrid between *Solanum brevidens* and *Solcmmum tuberosum*, *Genetics*, 135: 167-1173.

KAYNAKLAR (devam)

- Williamson, V. M., Ho, J. Y., Wu, F. F., Miller, N. and Kaloshian, I., 1994**, A PCR-based marker tightly linked to the nematode resistance gene, Mi, in tomato, *Theor. Appl. Genet.*, 87: 757–763.
- Wong, M. Y., 2003**, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder and H.N.Hans, PP728 Soilborne Plant Pathogen Class Project.
- Wu, K. S. And Tanksley, S. D., 1993**, Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice, *Mol Gen Genet*, 241: 225–235.
- Wu, M., He, D., Nie, Y., Zhang, X. And Lin, Z., 2003**, Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP, *Chinese Science Bulletin*, 48(19):2063-2067.
- Xu, Y., Yu, Y. J., Zhang, F. L., Zou, Z. R., Zhao, X. Y, Zhang, D. S., and Xu, J. B., 2007**, Linkage map construction and quantitative trait loci analysis for bolting based on a double haploid population of brassica rapa, *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(5):1744-1909.
- Xue-Xia, M., Bao-Liang, Z., Yan-Hui, L., Wang-Zhen, G. and Tian-Zhen, Z., 2008**, Simple Sequence Repeat Genetic Linkage Maps of A-genome Diploid Cotton (*Gossypium arboretum*), *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(4):491-502.
- Yang, W.C., Wang, H.Z, and Shen, J.X., 2006**, Comparison of cultivar fingerprints constructed with SRAP and SSR markers in *Brassica napus* L., *Chinese Journal Of Oil Crop Sciences*,28(3): 233-239.
- Yamakawa, K., and Nagata, N., 1975**, Three tomato lines obtained by the use of chronic gamma radiation with combined resistance to TMV and *Fusarium* race J-3. *Technical News, Inst. Rad. Breed.* 16. pp2.

KAYNAKLAR (devam)

- Yeboah, M. A., Xuehao, Chen., Feng, C. R., Liang, G. and Gu M., 2007**, A genetic linkage map of cucumber (*Cucumis sativus L*) combining SRAP and ISSR markers, *African Journal of Biotechnology*, Vol. 6 (24), 2784-2791
- Yeşilova, O., ve Karaca, G., 2007**, Determination of the effects of Arbuscular Mycorrhizal fungi on plant growth and *Fusarium* wilt of melon plants. III. Balkan Symposium on Vegetables and Potatoes. ISHS Acta Horticulturae 729.
- Young, N.D. and Tanksley, S.D., 1989**, RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around tm-2 locus of tomato during backcross breeding, *Theor. Appl. Genetic* 77: 353-359
- Yuanyuan, L., Jinxiong S., Tonghua, W., Qingfang, C., Xingguo, Z., Tingdong, F., Jinling, M., Jinxing, T, and Chaozhi M., 2007**, QTL analysis of yield-related traits and their association with functional markers in *Brassica napus L.*, *Australian Journal of Agricultural Research* 58(8):759–766.
- Yuan, X. J., Li, X. Z., Pan, J. S., Wang, G., Jiang, S., Li, X. H., Deng, S. L., He, H. L., Si, M. X., Lai, L., Wu, A. Z., Zhu, L. H. and Cai, R., 2007**, Genetic linkage map construction and location of QTLs for fruit-related traits in cucumber, *Plant Breeding*, 127(2):180–188.
- Yücel, S., 1989**, Domates *Fusarium* Solgunluğuna (*Fusarium Oxysporum* Schlecht *F. Sp Iycopersici* (Sacc.) Synd. And Hans) Karşı Biyolojik Kontrolde Antagonistlerin Ve Toprak Solarizasyon Uygulamasının Karşılıklı Etkileşimlerinden Yararlanma Olanakları Üzerinde Araştırmalar. Adana Zirai mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Araştırma Yayınları Serisi Yayın No: 64, Ankara.

KAYNAKLAR (devam)

Zhang, J., Yuan, Y., Niu, C., Hinchliffe, D. J, Lu, Y. and Yu, S., 2007, AFLP-RGA markers in comparison with RGA and AFLP in cultivated tetraploid cotton, *Crop Science Society of America*, 47:180–187.

Zhang, L.P., Khan, A., Niño-Liu, D. and Foolad, M.R., 2002, A molecular linkage map of tomato displaying chromosomal locations of resistance gene analogs based on a *Lycopersicon esculentum* × *Lycopersicon hirsutum* cross, *Genome*, 45: 133–146.

Zhu Shan, H., Wu, T, and Z Hang, Z., 2006, Inheritance Analysis and Identification of SSR Markers Linked to Late Blight Resistant Gene in Tomato, *Agricultural Sciences in China*, 5(7): 517-521.

Zink, F.W. and Gubber, W.D., 1986, Inheritance of resistance to races 0 and 2 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* gynecocious muskmelon, *Plant Disease*, 70:676-678.

ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Denizli’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini de Denizli’de tamamladıktan sonra 1993 yılında Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkilri Bölümüne girdi. 1997 yılında mezun olduktan sonra aynı üniversitede yüksek lisans eğitimime başladım. ‘Besleyici Film Tekniğinde (NFT) Yapılan Domates Yetiştiriciliğinde Fasilalı Akışın ve Bitki Tutunma Ortamlarının Etkileri Üzerine Araştırmalar’ konulu Yüksek Lisans tez çalışmasını tamamladı. 2000 yılında Ege Üniversitesi’ne bağlı Bergama Meslek Yüksek Okulu Seracılık Programında öğretim görevlisi olarak çalışmaya başladım. 2002 yılında Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü’nde ziraat mühendisi atandım. Halen aynı enstitüde ‘ Türkiye F1 Hibrit Sebze Çeşitlerinin Geliştirilmesi ve Tohumluk Üretiminde Kamu-Özel Sektör İşbirliği Projesi’ kapsamında ‘Örtüaltı Yetiştiriciliğine Uygun F1 Hibrit Domates Islahı’ projesini yürütmektedir. Evli ve bir çocuk annesidir.