

Domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığına dayanıklılık ve ters genetik

Resistance to bacterial canker and wilting disease of tomato and reverse genetics

Özer ÇALIŞ¹, Sevilay SAYGI², Demet ÇELİK², Yusuf BAYAN³

¹Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Taşlıçiftlik, Tokat

²Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Ordu Samsun Karayolu 17. Km Gelemen/Tekkeköy, Samsun

³Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Avşar Kampüsü, Kahramanmaraş

Sorumlu yazar (Corresponding author): Ö. Çalış, e-posta (e-mail): ozer.calis@gop.edu.tr

MAKALE BİLGİSİ

Alınış tarihi 21 Eylül 2012
Düzeltilme tarihi 1 Temmuz 2013
Kabul tarihi 9 Temmuz 2013

Anahtar Kelimeler:

Domates
Bakteriyel kanser ve solgunluk
Genetik dayanıklılık

ÖZ

Domatesin en önemli bakteriyel hastalıklarından olan bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı ekonomik ürün kayıplarına neden olmaktadır. Hastalığın kontrolünde kimyasal mücadele ve kültürel uygulamalar yetersiz kalmakta olup bakteriyel kanser hastalığının kontrolü için en uygun yöntem dayanıklı çeşitlerin kullanımınıdır. Bu çalışmanın amacı; bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığına karşı dayanıklı yabancı domates hatlarını ortaya koymak ve kültür domateslerinde oluşturulan kimyasal mutasyon sonucu elde edilen mutantlardaki dayanıklılığı Mendel genetiğini tersten ele alarak karakterize etmektir. Kimyasal mutasyona uğratılan EBR3 orijinal domates hattından elde edilen M3-9 ve M3-15 domatesleri bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* isolat 2 (*Cmm2*)'ye karşı dayanıklılığı genetik olarak sağlamaktadır.

ARTICLE INFO

Received 21 September 2012
Received in revised form 1 July 2013
Accepted 9 July 2013

Keywords:

Tomato
Bacterial canker and wilt disease
Genetic resistance

ABSTRACT

Bacterial canker and wilt disease, one of the most destructive diseases of tomatoes cause economic loss on tomato crops. Chemical control and cultural practices have inadequate methods to control the bacterial canker and wilting disease. However, the most appropriate method for the control of bacterial canker is the use of resistant varieties. This study aims to reveal resistant wild tomato lines and to characterise resistant mutants to bacterial canker disease with applying reverse Mendelian genetics. Chemical mutation on EBR3 tomato line exhibited resistant M3-9 and M3-15 mutant tomatoes to bacterial canker pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* isolate 2 (*Cmm2*). The promising mutants have provided genetic resistance to the bacterial pathogen.

1. Giriş

Anavatanı Güney Amerika'nın orta ve güney kısımları olduğu bilinen domates (*Solanum lycopersicum* L.) dünyada tarımı en fazla yapılan sebzelerden biridir. Kültür domatesi Amerika'dan Avrupa'ya, oradan da Afrika'ya geçmiştir. Bugün kültürü yapılmış olan domateslerin *S. habrochaites*, *S. peruvianum* ve *S. pimpinellifolium*'dan faydalanılarak geliştirildiği, ana materyalin ise *S. peruvianum* olduğu bilinmektedir (Vural ve ark. 2000). Domatesin Orta Amerika ve Güney Meksika'da çok sayıda tür ve çeşidi bulunmaktadır. Amerika kıtasında, ekvatorun 30° kuzey enlem ve 30° güney enlem sınırları arasında kalan bölgeler domatesin anavatanı kapsamı içerisinde kalmakta ve Güney Amerika'nın batı kıyılarının domatesin anavatanının merkezi olduğu bildirilmektedir (Günay 2005). Domatesin orijini olan Peru, Bolivya ve Ekvator'dan 16. yüzyılda İspanyollar tarafından Avrupa'ya getirilerek yetiştirilmeye başlanmıştır (Küçükler 1994). Avrupa'da uzun süre zehirli diye çekinilen domates daha sonra kültür bitkisi olarak kabul görmüştür (Ekinci 1972).

Anadolu'ya 150 yıl önce getirilmiş olup günümüzde yaygın olarak yetiştirilmekte ve sevilerek tüketilmektedir (Yazgan ve Fidan 1996).

Dünya domates üretimi 2010 yılında 145.751.507 ton (t) olup 10.052.000 t üretim ile en çok domates üretimi yapan ülkeler içinde Türkiye 4. sırada (Çizelge 1.) yer almaktadır (FAO 2012). Bu kadar çok üretimi yapılan domateste ekonomik kayıplara neden olan faktörlerin başında bitki hastalıkları gelmektedir (Agris 2005). Domateslerde fungal ve viral hastalık etmenlerinin yanı sıra pek çok bakteriyel etmen de önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır (Karaca ve Saygılı 1982). Domateste hastalık oluşturan bakteriler *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Erwinia*, *Agrobacterium* ve *Ralstonia* cinsleri içerisinde yer almaktadır (Üstün 2008). Bu bakteriyel hastalıklardan biri de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al.'in (*Cmm*) neden olduğu bakteriyel solgunluk ve kanser hastalığıdır. Bakteriyel

Çizelge 1. Dünya'da en çok domates üretimi yapan 5 ülkeye ait 2010 yılı üretim istatistikleri (FAO 2012).

Table 1. The most tomato producer 5 countries at 2010 and their tomato production statistics (FAO 2012).

Dünya Sıralaması	Ülke	Ekim Alanı (Hektar)	Üretim (Ton)
1	Çin	871.235	41.879.684
2	Amerika Birleşik Devletleri	159.200	12.902.000
3	Hindistan	619.800	11.979.700
4	Türkiye	304.000	10.052.000
5	Mısır	216.385	8.544.990

solgunluk ve kanser hastalığı tohum kaynaklı olması nedeniyle savaşımı güç hastalıklardandır (Erkan 1988). Etmen domates dışında fasulye, bezelye, mısırdaki da ürün kayıplarına neden olmaktadır (EPPO 2012).

Bakteriyel kanser hastalık etmeni kışı tohumlarda ya da toprakta kalan bitki artıklarında geçirebilmektedir. Hastalık etmeni genelde tohum ile taşınmakta olup tohum geliştikçe bakteri de bitki üzerinde önce kotiledon yapraklara ya da gerçek yapraklara geçerek sistemik olarak hastalık yapmaktadır. Bakteriyel kanser hastalık etmeni *Cmm* doğal açıklık ve yaralardan, özellikle kültürel işlemler (örneğin ipe alma, meyve toplama) esnasında oluşan yaralardan kolayca bitkiyi enfekte edebilmektedir. Hastalık etmeni bakteriler bitki içerisine girdiğinde xylem'de hızla çoğalarak floem iletim sisteminin çökmesi ve öz kısmının boşalması şeklinde belirtiler gösterir. Yapraklarda tek taraflı solgunluklar, gövdede kanserler görülür. Hastalıktan etkilenen solgun yapraklar kahverengileşerek ölürler (Agrios 2005).

Hastalığa karşı alınabilecek mücadele önlemleri, bu hastalığın primer inokulum kaynağı olan tohum kabuğu veya embriyoda bulunan bakterileri elemine etmeye yöneliktir (Özaktan 1991). Ancak uygulanabilirliği kabul edilmiş olan tohum uygulamaları da *Cmm*'e karşı her zaman etkili olmamakta, kültürel önlemlerle birlikte üreticiler yoğun olarak kimyasal kullanımına yönelmektedir. Kimyasalların kullanımının kolay, çabuk ve gözle görülebilir sonuçlar vermesi gibi özelliklere sahip olmasına rağmen hem ürün maliyetini artırması hem de çevre ve öteki canlılara verebileceği zararlar yüzünden her geçen gün kısıtlanmaktadır (Özcan ve ark. 2001). Bakteriyel kanser hastalığının kontrolünde en güvenilir yöntem dayanıklı domates çeşitlerinin kullanılmasıdır. Fakat domatesin anavatanı Türkiye olmadığı için bu bitkinin binlerce yıldır doğal düşmanları ile birlikte yaşayan yabancı akrabalarının bakteriyel hastalığın kontrolünde kullanılması zorunluluğu vardır. Çünkü domates başta Avrupa olmak üzere dünya ülkelerine yayılırken hastalık ve zararlılara dayanıklı olan çeşitler seçilmemiş, bu çeşitlerin yerine insanların istekleri doğrultusunda daha lezzetli, iri domates meyveli ve ekonomik önemi üstün olan domates türleri üretilmiştir. Dolayısıyla domatesin yeni üretim alanlarında başlangıçta önemli olmayan hastalıklar çevresel şartların da etkisiyle epidemiy yapmaya başlamıştır.

Domatesin orijini olan Latin Amerika'dan 1950'li yıllardan itibaren sistemik olarak domatesin tüm yabancı türleri ve akrabaları toplanmaya başlamıştır (TGRC 2012). Bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığına dayanıklı domatesin yabancı akrabalarının bulunduğu rapor edilmiştir. Fakat Türkiye'de ticari domates çeşitleri içerisinde bu bakteriyel kanser hastalığına dayanıklı çeşitler bulunmamaktadır. Bu çeşitler bazı yıllar uygun nem ve sıcaklıkta epidemiler yaparak tüm domates üretim alanlarında büyük kayıplar oluşturmaktadır. Nitekim 2010 yılında Türkiye'nin domates üretim alanlarında bakteriyel kanser etmeni *Cmm* salgınlar oluşturmuş bunun sonucunda üretiminin düşmesi sonucu domates fiyatları astronomik rakamlara çıkmıştır.

Domateste bakteriyel kanser hastalık etmenine karşı dayanıklı kültür domatesleri üretebilmek için erken yanıklık hastalığına dayanıklı (*Early Blight Resistant 3: EBR3*) fakat bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığına hassas, ekonomik özellikleri iyi olan EBR3 domates hatlı kimyasal mutasyona uğratarak oluşturulan bir bazlık mutasyon sonucu bakteriyel kanser *Cmm2* hastalık etmenine dayanıklı domates mutantları taranmıştır. Bu makalenin amacı, yapılan mutasyon ve sonrasında taranan mutantlardaki fenotipik, genetik ve dayanıklılığın karakterizasyonunu ortaya koymaktır.

2. Materyal ve Metot

Çalışma 2008-2010 yıllarında Tokat domates üretim alanlarında bakteriyel kanser hastalık etmenin salgın yapmasıyla bu hastalığa karşı genetik olarak dayanıklı domates çeşitlerinin üretimi hedeflenerek başlanmıştır. Domatesin yabancı akrabalarının testlenmesi sonucu yabancı domateslerden dayanıklı genotipler bulunmuş fakat bu genotiplerden kültür domateslerine dayanıklılık genin aktarılmasının hem güç hem de mevcut Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar (GDO) yönetmeliğine göre dayanıklı transgenik bitkilerin üreticinin emrine sunulamayacağı düşünüldüğüne çalışmalara başlanmıştır.

2.1. Çalışmada kullanılan test bitkileri

Çalışmada kullanılan domates NCEBR 1-6 hatları Prof. Dr. Randy GARDNER (Horticultural Science, North Carolina University, USA) tarafından hediye edilmiştir. Yabancı domates tohumları ve kültür domates tohumu NC84173 University of California tarafından oluşturulan Tomato Genetics Resource merkezinden (<http://tgrc.ucdavis.edu>) temin edilmiştir. Ticari domates Esin çeşidi Zeraim Gedera (Samsun), Suvvari, Newton ve Alkan çeşitleri Yüksel Tohumculuk (Antalya) firmalarından temin edilmiştir.

2.2. Bitkilerin yetiştirilmesi

Kültür, yabancı ve mutant domateslerin tohumları viyollere ekilmiştir. Viyollerde çimlenen ve 2-3 gerçek yapraklı döneme ulaşan domates fideleri içerisinde buhar ile sterilize edilmiş torf bulunan 7 numaralı saksılara şaşırılmıştır. Saksılardaki bitkiler Ziraat Fakültesi Biyoteknoloji laboratuvarı serasında 16 saat (h) gündüz, 8 h gece ışıklanmaya sahip, % 50 nispi nem içeren, 22±3°C derecede tutulan kontrollü ortama yerleştirilmiştir. Bitkilerin sağlıklı gelişebilmesi için topraktan ve yapraklardan besin maddeleri takviyesi yapılmıştır.

2.3. Bakteriyel kanser ve solgunluk bakterilerinin temini

Bakteriyel etmen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*' in en virulent straini olan *Cmm2* Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hüseyin BASIM'dan temin edilmiştir.

2.4. Bakteriyel hastalık etmeninin besi ortamında geliştirilmesi

Besi ortamı Glucose Yeast Carbonate Agar (GYCA): 5 g

glucose, 5 g yeast ekstrakt, 40 g kalsiyum karbonat sırasıyla tartılarak içerisinde distile su (dsH_2O) eklenmiştir. Besi ortamının pH'sı 7.2'ye ayarlanarak toplam 1 litre suya tamamlanmıştır. Sonrasında karışıma 15 g agar ilave edilmiştir. GYCA besi yeri $121^{\circ}C$ 'de 1 atm basınçta 20 dk. otoklav edildikten sonra oda sıcaklığındaki besi ortamı steril plastik petrilere dökülüp donması sağlanmıştır. Stokta bulunan *Cmm2* izolatından öze ile alınarak steril kabinde GYCA besi ortamına 3'lü çizimi yapılmıştır. Petri kapları ekim yapıldıktan sonra etrafi streç film ile sarılıp patojenin gelişebilmesi için en uygun sıcaklık olan $28^{\circ}C$ 'de etüvde 3 günlük süre ile bekletilerek bakterilerin gelişimi sağlanmıştır.

2.5. Patojenisite testleri

Patojenisite testleri hastalık etmenine dayanıklı ve hassas domates bitkilerini ortaya koyabilmek için yapılmıştır. Bu amaçla steril şartlarda besi ortamında geliştirilen *Cmm2* izolatları steril bir kürdan yardımıyla alınarak 5-8 gerçek yapraklı domates fidelerinin gövdelerine iliştirilerek inokulasyonlar gerçekleştirilmiştir (Yıldız 2007). Kontrol olarak bakteriyel kansere çok hassas orijinal EBR3 domates hattı seçilmiştir. Bu EBR3 domates hattı, ticari domatesler ve kimyasal mutasyona uğratan mutan (M2, M3, M4 ve M5) populasyonları patojenisite testlerinde kullanılmıştır. Kontrol olarak hem mutanlar hem de orijinal EBR3 domates bitkileri steril su içerisinde batırılmış kürdanın bitkiye iliştirilmesiyle inokulasyon sağlanmıştır. Aksi belirtilmedikçe, her deneme için en az 10'ar adet orijinal ve mutan domates bitkileri kontrol olarak kullanılmıştır.

2.6. EBR3 domates hattının kimyasal mutasyona uğratılması

Cmm2'ye karşı hassas olan EBR3 domates hattının mutasyona uğratarak dayanıklı mutan tohumların elde edilmesi amaçlanmıştır. Öncelikle 200 adet domates tohumu 8-10 saat boyunca ıslak kurutma kağıdına konmuştur. Daha sonra 20 ml distile su içerisinde % 0,5 ethyl methanesulfonate (EMS) solüsyonu hazırlanmış ve tohumlar 12 saat boyunca çalkalayıcıda bekletilmiştir. EMS mutajeni C/G'nin T/A'ya dönüşümüne sebep olan bir bazlık mutasyon oluşturan bir kimyasaldır. Çalkalayıcıda 12 saat karıştıktan sonra tohumlar EMS solüsyonu içerisinde alınarak çeşme suyunda 10 dakika (d) boyunca yıkanmıştır. EMS solüsyonuna ise 150 ml 1M NaOH ilave edilerek nötr hale getirmek amacıyla bir gün bekletilerek EMS ortamdan uzaklaştırılmıştır. Çeşme suyunda yıkanan tohumlar petri içerisinde kurutma kağıdı üzerine alınarak 1-2 saat kurutulmuştur. Aynı gün içerisinde tohumlar viyollere ekilerek sera şartlarında yetiştirilmiştir. Mutan tohumların ekimden 8 gün sonra çimlendikleri gözlenmiştir. Mutasyona uğratan 200 tohumdan tümü ekilmiş, 191 tanesi çimlenerek saksılara şaşırtılmıştır.

2.7. M2 bitki tohumlarının eldesi ve bitkilerin *Cmm2* ile inokulasyonu

Ekilen M1 bitkileri kontrollü şartlar altında büyütülerek meyvelerinden 4000 adet M2 bitki tohumu elde edilmiştir. Elde edilen M2 bitki tohumları karıştırılarak bir bulk oluşturulmuştur. Bu bulkten 600 adet mutan domates tohumu Biyoteknoloji serasında viyollere ekilmiştir. Ekilen tohumlardan çimlenen 500 adet bitki büyük saksılara şaşırtılmıştır. Saksılara şaşırtılan 500 fideden 50 tanesi kontrol olarak ayrılmış, 450 fide ve 30 orijinal EBR3 fidelerine steril kürdan yardımıyla *Cmm2* inokule edilmiştir. İnokulasyonun başarısı için kürdan ile inokule edilen bitkilere inokulasyondan 10 gün sonra gövdenin

köke yakın kısımlarından her bitkiye 5 ml olmak üzere enjektör ile *Cmm2* bakterisi solüsyonu uygulaması yapılmıştır. Kontrol olarak ayrılan 50 adet M2 fidesi ve 20 adet EBR3 orijinal bitkilerine sadece steril distile suya daldırılmış kürdan ile inokulasyon gerçekleştirilmiştir.

2.8. Diğer M3, M4 ve M5 populasyonlarının oluşturulması

Patojenisite testlerinden geçirilen M2 mutan bitkilerinden bakteriyel kanser ve solgunluk etmeni *Cmm2*'ye dayanıklı bulunan 15 adet bitkinin domates meyvelerini oluşturması sağlanmıştır. Meyve oluşturan M2 mutan domateslerinden elde edilen tohumlar M3 populasyonundaki bitkileri oluşturmuştur. Elde edilen M3 populasyonundaki 15 mutan için her birinden 10'ar adet bitki yetiştirilerek bitkilerin yarısı *Cmm2* ile diğer yarısı da kontrol olarak dsH_2O ile test edilmiştir. Fenotipik olarak *Cmm2*'ye ümitvar dayanıklı M3-9 ve M3-15 mutan bitkilerinin domates meyvelerini oluşturmalarına izin verilerek önce M4 ve sonrasında M5 populasyonları üretilmiştir. Burada M4 ve M5 populasyonları üretilirken açılmamış domates çiçekleri parşömen melezleme kağıtlarına alınmamış, biyoteknoloji serası içerisinde diğer orijinal EBR3 ve ticari çeşitlerle tozlanmasına izin verilmiştir. Patojenisite testlerinde dayanıklı bulunan ümitvar M3-9 ve M3-15 mutan bitkileri kontrolleri ile birlikte *Cmm2* bakterisiyle M4 ve M5 generasyonlarında testlenmiştir.

2.9. Bitkilerin melezlenmesi

Ümitvar dayanıklı bulunan M3-9 ve M3-15 domates bitkileri çiçeklenme dönemine geldiğinde birbirleriyle melezlenerek F_1 hibrit melez bitkileri oluşturulmuştur. Melezleme işleminde her iki ebeveynin tamamen açılmış çiçeklerinden petri içerisinde polen tozları alınmıştır. Petri kabı içerisindeki polenler hafifçe ezilip toz haline getirilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Ümitvar dayanıklı ebeveyn bitkilerinin tam açılmamış olan çiçekleri bir pens yardımı ile önce taç ve çanak yaprakları açılmıştır. Daha sonra polen ana hücreleri dişicik borusuna zarar vermeden, dişicik borusu yalnız kalacak şekilde uzaklaştırılmıştır. Yalnız bırakılan dişicik borusuna hazırlanmış olan diğer bitkinin (donor) polenleri değiştirilerek tozlanma işlemi gerçekleştirilmiştir. Melezleme yapılan çiçek, yabancı tozlanmayı engellemek için parşömen kağıdından yapılan işiği ve havayı geçiren, kese kağıtlara konularak kapatılmıştır. Melezleme işleminin başarılı olabilmesi için bu işlem bir gün aralıkla 3 defa tekrarlanmış ve bir bitkide en fazla üç tane çiçeğe melezleme yapılmıştır.

3. Bulgular

3.1. Hassas ve dayanıklı yabancı domatesler

Domates Genetik Kaynaklar Merkezinden (TGRC) temin edilen domatesin yabancı akrabaları *Cmm2* ile test edildikten sonra bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığına dayanıklı ve hassas yabancı domatesler belirlenmiştir (Çizelge 2). Çalışmada kullanılan 15 adet yabancı domates hattının (accession) 2 adedi (LA1054 ve LA1318) *Cmm2*'ye çok dayanıklı bulunurken (Çizelge 2), 7 adedinin (LA1362, LA1352, LA1365, LA1395, LA1377, LA1149 ve LA1033) orta (intermediate) dayanıklı (Çizelge 2), 4 adedinin (LA1342, LA1393, LA1579, LA1265) orta hassas ve 2 adedinin (LA1391 ve LA1106) çok hassas olduğu ortaya konmuştur (Çizelge 2). Özellikle çok hassas fenotipler inokulasyondan 7 gün sonra yapraklarda yoğun solgunluk oluştururken çok dayanıklı fenotiplerde herhangi bir solgunluk semptomuna rastlanmamıştır. İnokulasyondan 15 gün

sonra çok dayanıklı (LA1054 ve LA1318) yabancı domatesler dışındaki tüm domatesler ölmüştür.

3.2. *Cmm2*'ye dayanıklı mutant bitkilerin bulunması

Hassas EBR3 domates bitkilerine yapılan EMS mutasyonu sonucu bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığına dayanıklı mutant bitkilerin bulunması oldukça uzun bir süreçtir. Dayanıklı M2 ve M3 mutantların elde edilmesi çalışmaları detaylarıyla Çalış ve ark. (2012)'de verilmiştir. Burada patojenisite testleri M3-9 ve M3-15 mutantlarının bakteriyel kanser hastalığına karşı dayanıklı fenotipler olması nedeniyle bu 2 bitkideki dayanıklılığın genetik karakterizasyonunu ortaya çıkarma zorunluluğunu oluşturmuştur. Bu nedenle materyal ve metot kısmında belirtildiği gibi çalışmalar M4 ve M5 popülasyonlarına taşınmıştır. Ümitvar dayanıklı bulunan M3-9 ve M3-15 mutant domates çeşitlerinin M4 popülasyonunda

Cmm2 ile testlenmesi sonucunda M4-9 mutant bitkilerinden test edilen 20 bitkiden 5 tanesi *Cmm2*'ye karşı hassas fenotipler oluşturmuştur. Fakat *Cmm2* ile inokule edilen 20 adet M4-15 mutant bitkisinin tümü dayanıklı fenotipler göstererek bu bitkilerde bakteriyel solgunluk ve kanser belirtileri bulunmamıştır. Patojenisite testlerinden geçirilen M4-15 dayanıklı mutant bitkilerinin tümünden, M4-9 mutantların dayanıklı fenotip gösterenlerden tohumlar alınarak M5 popülasyonları oluşturulmuştur. Hassas fenotipe sahip M4-9 bitkileri atılmıştır. Ümitvar dayanıklı bitkilerden yetiştirilen 20'şer adet M5-15 ve M5-9 domates bitkileri yeniden *Cmm2* ile test edildiğinde M5-15 ve M5-9 domates mutantlarının tümü hassas fenotipler göstermiştir (Şekil 1). Ümitvar M3-9 ve M3-15 mutant bitkilerinin M5 popülasyonunda tamamen hassas fenotipler göstermiş olup bu mutant domateslere ortamda bulunan orijinal EBR3 ve ticari domateslerden (Esin, Süvari,

Çizelge 2. Patojenisite testlerinde kullanılan yabancı domates hatlarının *Cmm2*'ye karşı fenotipik reaksiyonları.

Table 2. Phenotypic reactions of tomato accessions which were tested with *Cmm2* in pathogenesis analysis.

Cmm2 ile test edilen domateslerin fenotipleri			
Çok dayanıklı	Orta dayanıklı	Orta hassas	Çok hassas
LA1054	LA1362	LA1342	LA1391
LA1318	LA1352	LA1393	LA1106
	LA1365	LA1579	
	LA1395	LA1265	
	LA1377		
	LA1149		
	LA1033		



Şekil 1. Patojenisite testlerinde kullanılan, kontrolsüz olarak orijinal EBR3 ve diğer ticari domateslerle melezlenmelerine izin verilerek oluşturulmuş M4 ve M5 popülasyonu mutantların *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolat 2 (*Cmm2*) ve distile steril su (kontrol) ile inokulasyonundan 15 gün sonraki fenotipleri.

Figure 1. Original tomato EBR4 plants, M4 and M5 populations which were pollinated with other commercial plants were inoculated with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolate 2 (*Cmm2*) and distilled sterile water as positive control and their phenotypes at 15 days post inoculation.

Alkan ve Newton) gelen polenler sonucunda çekinik kalıtım gösteren dayanıklılık lokusunun baskılandığı anlaşılmaktadır (Şekil 1).

3.3. Ümitvar dayanıklı mutantlarda kalıtım

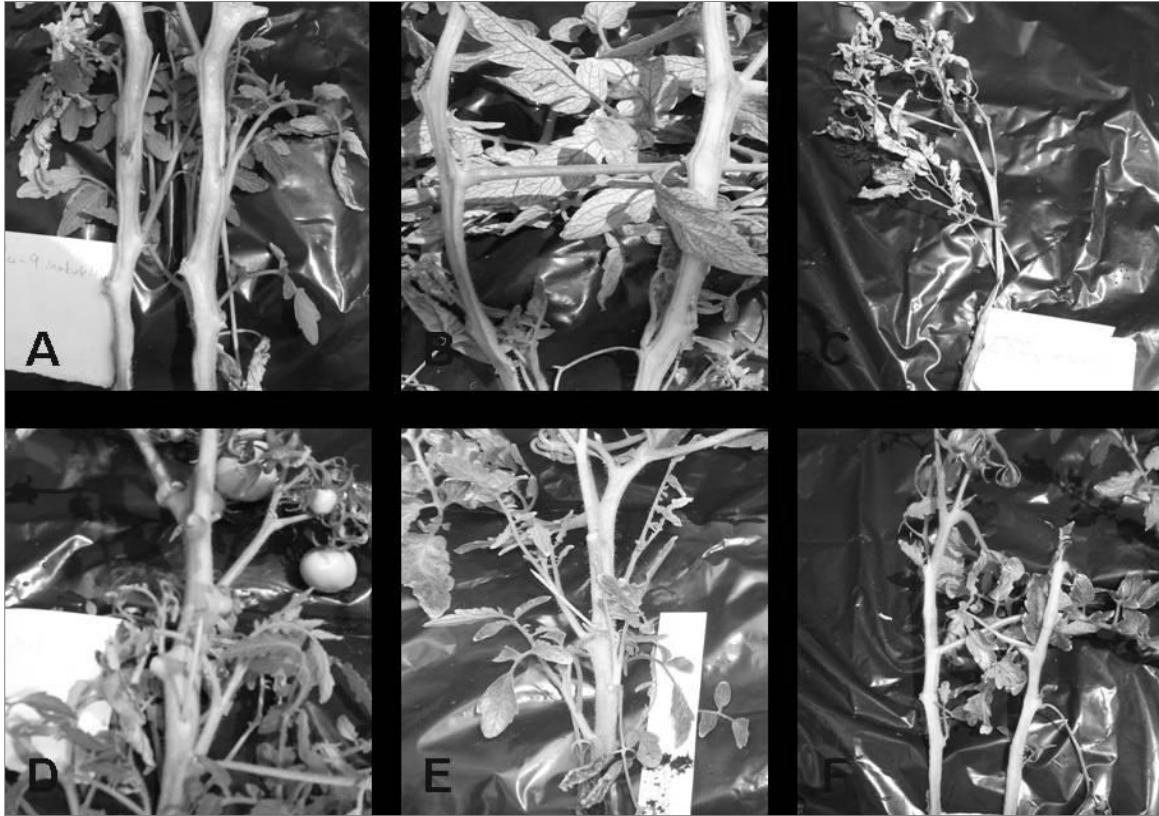
Ümitvar dayanıklı M3-9 ve M3-15 mutantları tekrar test edilip açmayan çiçekleri materyal ve metotta belirtilenin aksine parşömen kâğıdından yapılan melezleme torbalarına alınarak kendilenmeye bırakılmıştır. Buradan elde edilen M4-9 ve M4-15 mutant bitkilerinin *Cmm2* ile inokulasyonları sonucunda tüm test edilen bitkiler dayanıklı bulunmuştur (Şekil 2). Mutasyon sonucu ümitvar bulunan bu 2 mutantın birbirleriyle melezlenmeleri (M4-9 ♀ x ♂ M4-15 veya M4-15 ♀ x M4-9 ♂) gerçekleştirilmiştir. Fakat bu mutantların melez populasyonu olan bitkilere henüz patojenisite testleri uygulanmamıştır. Diğer taraftan ümitvar dayanıklı olan M4-9 ve M4-15 mutantların farklı ticari domates çeşitleri ile melezlenmesi sonucunda mutant bitkilerin genetik zenginlikleri artırılmaktadır. Melezlemeler sonucunda oluşturulan M4-9 ve M4-15 mutantlarının F₁ bitkilerine uygulanacak patojenisite testleri sonucunda bu iki mutant bitkideki dayanıklılık karakterize edilecektir. Patojenisite testlerinde oluşturulan F₁ bitkileri hassas ise mutasyonun farklı yerlerde olduğu, dayanıklı ise aynı yerde olduğu anlaşılacaktır. Çünkü farklı mutasyonlara sahip bitkilerde çekinik karakterde kalıtım gösteren genin orijinal alleleri bulunacağından M4-9 ve M4-15 mutantlarının farklı olduğu, aynı mutasyona sahip bitkilerin ise aynı alleleri F₁ populasyonuna aktaracağından M4-9 ve M4-15 mutantlarının

aynı yerde genetik mutasyona sahip olduğu tasdik edilecektir.

4. Tartışma ve Sonuç

Domates genetik kaynaklar merkezinden (TGRC) temin edilen 17 farklı yabancı domates hattı üzerinde gerçekleştirilen patojenisite testleri sonucunda 2 adet yabancı domates hattının *Cmm2*'ye çok dayanıklı olduğu bulunmuştur. Bu 2 dayanıklı yabancı domates hattı üzerinde daha fazla genetik çalışma yapılmamış olup kültür domateslerinde bakteriyel kanser hastalığına dayanıklı bitkilerin bulunması konusunda çalışılmıştır. Domates üretiminde önemli ürün kayıplarına neden olan bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığına karşı genetik olarak dayanıklı olan kültür domates mutantlarının varlığı bu çalışmayla ortaya konmuştur. Özellikle kültür domatesi olan ve bakteriyel kanser hastalığına hassas EBR3 hattının kimyasal mutajen EMS ile mutasyonu sonucunda M3-9 ve M3-15 bitkilerinin *Cmm2*'ye karşı M3 ve M4 populasyonlarında dayanıklılığı genetik olarak kontrol ettiği bulunmuştur.

Çalışmalarda M3-9 ve M3-15 mutant bitkilerinin orijinal ve ticari domates çeşitleri ile sera içerisinde doğal olarak polen alış-verişine izin verilmiş olup bu yolla elde edilen M4 populasyonunda M4-9 mutant bitkilerinin bir kısmının, M5 populasyonunda ise M5-9 ve M5-15 mutant bitkilerinin tümünün dayanıklılığını kaybettiği ortaya konmuştur. Bu sonuçlar mutant bitkilerdeki dayanıklılığın çekinik (recessive) karakterde kalıtım gösterdiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 2. Patojenisite testlerinde kullanılan, kontrollü olarak üretilen M4-9 ve M4-15 mutant bitkilerinin *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolat 2 (*Cmm2*) ve distile steril su (kontrol) ile inokulasyonundan 15 gün sonraki görünimleri.

Figure 2. M4-9 and M4-15 mutant plants which were produced under controlled environment were inoculated with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolate 2 (*Cmm2*) and distilled sterile water as positive control and their phenotypes at 15 days post inoculation.

Muhtemelen çekinik karakterde bir genin bu mutantlarda dayanıklılığı kontrol ettiği, genin dominant allelinin bulunduğu durumlarda dayanıklılığı kaybettiği anlaşılmaktadır.

Kimyasal mutasyon sonucunda bakteriyel kanser ve solgunluk etmeni *Cmm2*'ye dayanıklı bulunan M3-9 ve M3-15 mutantlarının aynı ya da farklı genetik yapıda olduğunu ortaya koyacak olan melezlemeler gerçekleştirilmiş olup bu melezler üzerinde henüz patojenite testleri uygulanmamıştır. Kültür domateslerinde kimyasal mutasyon sonucu dayanıklı mutantların ters Mendel genetiği kullanılarak ortaya çıkarılması ve ümitvar dayanıklı mutant bitkilerin kültür bitkilerinde ortaya konması önemli bir adımdır. Özellikle ümitvar dayanıklı bulunan M3-9 ve M3-15 mutant bitkilerinde oluşturulan mutasyon sonucunda hangi genetik yapının değiştirildiği ve bu değişim sonucunda dayanıklılığı sağlayan gen ve bu genlerin kodladığı protein yapıları, ilişki içerisinde bulunduğu sinyal yolunun ortaya konması gerekmektedir. Bu amaçla bugüne kadar gerçekleştirilen çalışmalarda kültür domateslerinde genetik olarak bakteriyel kanser hastalığının kontrol edilebileceği ortaya konmuş olup moleküler olarak dayanıklılığı sağlayan protein ve diğer protein yapılarının aydınlatılması çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Gelecekte gerçekleştirilecek moleküler çalışmalar için M3-9 ve M3-15 mutantlarında genetik olarak arka planı zenginleştirmek amacıyla ticari domates çeşitleri ile kontrollü melezlemeler yapılmaya başlanmıştır. Bu mutant domateslerin moleküler markörler ile analizlerini kolaylaştıracaktır.

Teşekkür

Yazarlar ticari domates çeşitlerini çalışmalarda kullanım için sunan Yüksel Tohumculuk (Antalya) ve Zeraim Gedera (Samsun) firmalarına özel olarak teşekkürü borç bilmektedirler. Ayrıca elindeki en virulent bakteriyel kanser etmenini bizlerle paylaşarak çalışmalarımızda kullanmamıza izin veren Prof. Dr. Hüseyin BASIM'a teşekkür ederiz. Bu çalışma Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiş olan 2008/47, 2010/106 ve 2010/107 no'lu yüksek lisans projelerinin bir bölümüdür.

Kaynaklar

Agrios GN (2005) Plant Pathology. Fifth Edition. Elvieser Academic Pres, London.

Çalış Ö, Bayan Y, Çelik D (2012). Characterization of resistant tomato mutants to bacterial canker disease. African Journal of Biotechnology 11: 8070-8075.

Ekinci, S. (1972) Özel Sebzeçilik. Ahmet Sait Matbaası, İstanbul.

EPPO (2012). Data sheets on quarantine pests *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*. http://www.eppo.int/QUARANTINE/bacteria/Clavibacter_m_michiganensis/CORBMI_ds.pdf . Accessed 3 March 2012.

Erkan S (1988) Tohum Patolojisi. Gözdem Ofis, İzmir.

FAO (2012). Statistical database. <http://faostat.fao.org/site/> Accessed 6 July 2012.

Günay A. (2005) Sebze Yetiştiriciliği Cilt II. Meta Basımevi, İzmir.

Karaca İ, Saygılı H (1982) Batı Anadolu'nun bazı illerinde domates ve biberde görülen bakteriyel hastalıkların oranı, etmenleri ve konukçu çeşitlerinin duyarlılığı üzerine araştırmalar. III. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 12-15 Ekim, Adana, s.182-192.

Küçükler O (1994) Tıbbi Biyologlar için Botanik Ders Kitabı. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, İstanbul.

Özaktan H (1991) Domates bakteriyel solgunluğu (*Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* (Smith) Davis et al) ile savaşım olanakları üzerine araştırmalar. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Özcan S, Gürel E, Babaoğlu M (2001) Bitki Biyoteknolojisi II: Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya.

Üstün N (2008) Patates Kahverengi Çürüklük Hastalığı Brown Rot of Potato Domates ve Sardunya Bakteriyel Solgunluk Hastalığı Southern Bacterial Wilt of Tomato and Geranium Muz Moko Hastalığı Moko Disease of Banana Tütün Granville Solgunluğu Granville Wilt of Tobacco *Ralstonia solanacearum*. (Eds: H. Saygılı, F. Şahin, Y. Aysan), Bitki Bakteri Hastalıkları, Meta Basım, İzmir, s. 127-134.

Vural H, Eşiyok D, Duman İ (2000) Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme). Ege Üniversitesi Basım Evi, İzmir.

Yazgan A, Fidan S (1996) Tokat koşullarına uygun kiraz domates (*Lycopersicon esculentum* Mill. var. *cerasiforme*) çeşitlerinin belirlenmesi. GAP 1. Sebze Tarımı Sempozyumu, Şanlıurfa, s. 19-23.

Yıldız RÇ (2007) Domates bakteriyel solgunluk hastalığı etmeni (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et. al.)'nin tanılanması ve bitki büyüme düzenleyicisi rhizobakteriler ile biyolojik mücadele olanaklarının araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana.