

**DOMATES HATLARINDA *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* YE
DAYANIKLILIĞIN MOLEKÜLER MARKÖRLER YARDIMIYLA
BELİRLENMESİ**

Hasan PINAR^{1*} Atilla ATA¹ Davut KELEŞ¹ Nedim MUTLU² Nihal DENLİ¹
Mustafa ÜNLÜ¹

¹Alata Bahçe Kültürleri Araştırma İstasyonu, Mersin

²Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya

Alınış Tarihi: 16.09.2012 Kabul Tarihi: 24.05.2013

Özet

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* (FOL) domates üretiminin yoğun olarak yapıldığı alanlarda yaygın olup üretim alanlarında büyük kayıplara sebep olmaktadır. Diğer bitki türlerinde olduğu gibi söz konusu hastalıkla savaşıma konusunda biyolojik ve kimyasal mücadele yetersiz kalmaktadır. Bu sorunun en etkin çözümü dayanıklı çeşit kullanımıdır. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*ye dayanıklılık, klasik ve moleküler markör yardımcı seleksiyon (MAS) ile birçok ticari çeşitlere aktarılmış durumdadır. Fakat bu hastalığa dayanıklı yeni çeşitlerin geliştirilmesinde moleküler markörlerin kullanımı allelik olmayan ırk-spesifik dayanıklılık genlerinin bir hat üzerinde piramitlenmesine imkan vermektedir. Domateste FOL ırklarına (0, 1, 2) dayanıklılık sağlayan genlere bağlı markörler geliştirilmiş ve rutin ıslah programlarında kullanılmaktadır. Bu çalışmada, Alata Bahçe Kültürleri Araştırma İstasyonu Müdürlüğü domates gen havuzunda yer alan verim ve bazı kalite özellikleri bakımından ön plana çıkan 450 adet domates hattında I-1 ve I-2 genlerine bağlı olarak geliştirilen SCAR ve CAPS markörleri ile tarama yapılmıştır. Domates hatlarının 88 adeti I-1 geni, 74 adeti I-2 geni dayanıklılık alleline ait bantı üretmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* etmenine karşı dayanıklılık için geliştirilmiş moleküler markörlerin söz konusu popülasyonlarda çeşit geliştirmede rahatlıkla kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Domates, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, SCAR, CAPS

*Sorumlu yazar: hpinarka@yahoo.com

DETERMINATION OF RESISTANCE TO *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* VIA MOLECULAR MARKERS IN TOMATO LINES

Abstract

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* (FOL) is common in tomato production areas where intensive production causes huge losses. Other plant species as well as biological and chemical control is insufficient to fight with the disease. The most effective solution to this problem is the use of resistant varieties. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* resistance has been transferred to most of the commercial varieties via classical and molecular marker-assisted selection (MAS). The use of molecular markers in the development of new varieties resistant to this disease, but not allelic race-specific resistance genes allows pyramiding to these genes at one cultivar. Markers which linked to resistance genes for FOL races (0, 1, 2) were improved and routinely used in tomato breeding programs. In this study, 450 pure tomato lines from the gene pool of tomato to the fore in terms of yield and some quality characteristics in Alata Horticultural Research Station Directorate were screened for *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) resistance via developed SCAR and CAPS markers linked to I-1 and I-2. The 88 tomato lines had I-1 gene and 74 of tomato lines yielded band of homozygote resistance allele for I-2. Obtained results in this study show that developed molecular markers for *Fusarium oxysporum* f. sp. resistance can use easily for the developing of new cultivars.

Keywords: Tomato, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, SCAR, CAPS

1. GİRİŞ

Domates dünyada en fazla üretilen sebze türlerinden birisidir. Dünyada olduğu gibi Türkiye içinde domates önemli ürünler arasında yer almaktadır. Yıllık 129 milyon ton (FAO, 2010) dünya üretiminin içerisinde Türkiye 10 milyon ton üretim değeri ile 3. sırada yer almaktadır.

Domates yetiştiriciliğini sınırlandıran ana faktörlerden birisi virüs, bakteri, nematod ve fungus vb. biyotik etmenlerin sebep olduğu verim kayıplarıdır. Hastalık ve zararlıların yayılmasının kontrolünde 3 strateji benimsenmektedir. Bunlar kimyasal uygulamalar, kültürel uygulamalar ve dayanıklı çeşit kullanımıdır. Kimyasal uygulamalarının bazı hastalık ve zararlıların yayılmasını bir miktar önlemesine rağmen; çiftçiler için risk oluşturması, girdi maliyetlerinin

artırması ve kalıntı problemleri nedeniyle kullanılabilirliği kısıtlıdır. Kimyasal ve kültürel uygulamalarla hastalık ve zararlı kontrolü de bazı zamanlarda tam anlamıyla mümkün olamamaktadır. Dayanıklı çeşit kullanımı ise en etkin mücadele yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır.

Moleküler markörler 1980'den itibaren birçok bitkide yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle domateste hastalıklara dayanıklılık genleriyle bağlantılı markörler geliştirilmiş olup ıslah programlarında kullanılmaktadır. Şimdiye kadar 40'dan fazla gen (tek gen ve QTL) haritalanmıştır (Grube vd., 2000). Haritalanan bu özellikler moleküler markörler yardımıyla seleksiyon yöntemiyle ıslah programlarında kullanılmaktadır.

Moleküler markör yardımıyla seleksiyon (MAS, Marker Asisted Selection) 1990'dan bu yana klasik yöntemlerle birlikte kullanılmakta ve ıslah programlarına hız kazandırmaktadır. MAS'ın kullanılmasının nedenleri; bazı önemli dayanıklılık kaynaklarının yabancı türlerde olması, erken seleksiyonla ıslah süresinin kısaltılabilmesi, geriye melezleme ile dayanıklılığın aktarılmasında kolaylık sağlaması, genler arasındaki bağlantının (linkage) kırılmasında kolaylık sağlaması, taranması zor olan özelliklerin belirlenmesinde kolaylık sağlaması, karantina kapsamındaki bazı hastalık ve zararlıya dayanıklılık için testlemeye gereksiniminin olmaması, dolayısıyla daha az sayıda bitki ile çalışmaya imkan sağlayarak iş gücü ve maliyet bakımından avantaj sağlaması olarak sıralanabilir.

Moleküler markörlerin ıslahta kullanılmasında markör tipi çok önemlidir. Bu sebeple özellikle MAS'ta co-dominant markörler kullanılmaktadır. Co-dominant markörler heterozigot ve homozigot bireyleri ayırabilmektedir. MAS programları genellikle co-dominant SCAR ve CAPS markörleri üzerine yoğunlaşmıştır (Bertrand vd., 2008). Bu markör sistemlerinin çok fazla alet ve ekipmana, işgücü ve maliyete gereksiniminin olmaması diğer sistemlere göre avantaj sağlamaktadır (Kumar vd., 2009).

Domates için çeşitli araştırmacılar tarafından nematod, domates mozaik virüsü, *Verticillium* solgunluğu, domates lekeli solgunluk virüsü ve domates sarı yaprak kıvrıklığı virüsünde olduğu gibi *Fusarium* solgunluğuna dayanıklılığı belirlemek için SCAR ve CAPS markörleri geliştirilmiş ve ıslah programlarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Barone, 2004).

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen toprak kökenli bir fungus olup domateste (*Solanum lycopersicum*) solgunluğa neden olmaktadır. Bu fungus köklerin iletim demetlerine enfekte olup su taşınmasını

engelleyerek bitkinin hızlı bir şekilde ölümüne neden olmaktadır (McGrath vd., 1987; Malhotra ve Vashista, 1993). Fungusun neden olduğu solgunluk ve sonrasındaki ölümle mücadele çoğunlukla kimyasal uygulamanın da içinde yer aldığı kültürel tedbirlerle yapılmaktadır. Fakat yalnız başına kültürel uygulamalar çözüm olmamaktadır. Söz konusu hastalığa karşı dayanıklı çeşit kullanımı ön plana çıkmaktadır.

F. oxysporum lycopersic'nin ırk 1, 2 ve 3 olmak üzere 3 adet ırkı tanımlanmıştır (Stevens ve Rick, 1986; Beckman, 1987). Dört adet R geni genetik olarak haritalanmış ve yabancı çeşitlerden ticari çeşitlere aktarılmıştır (Huang ve Lindhout, 1997; Frary ve Tanksley, 2001). Bu genlerden I-1 ve I-3 7. kromozomda I ve I-2 ise 11. kromozomda yer almaktadır (Stall ve Walter, 1965). I-2 genine bağlı bir CAPS (TAO1902) markördür (Staniaszek, 2007; Simons vd., 1998; Scott vd., 2004).

Söz konusu hastalık nematod, virüsler ve bakteriyel hastalıklarla birlikte dünyada olduğu gibi Türkiye'de de önemli verim kayıplarına neden olmaktadır. Domates üretiminin yoğun olarak yapıldığı Doğu Akdeniz Bölgesinde *F. oxysporum*'un formlarının neden olduğu domates kök ve kök boğazı çürüklüğü (FORL) ile domates *Fusarium* solgunluğu (FOL) ekonomik kayıplara neden olan en önemli hastalıklardır. Adana ve Mersin illerinde örtü altı domates yetiştiriciliği yapılan seralarda 2007-2008 yılları arasında yürütülen sörvey çalışmalarında *F. oxysporum*'un neden olduğu FORL ve FOL hastalıklarının hastalık çıkışı ve şiddeti, sırasıyla % 35.1, % 18.8 ve % 43.3, % 20.4 olarak saptanmıştır. Adana ilinde hastalık yaygınlığı hastalıklı sera sayısı açısından % 56.1, hastalıklı sera alanı açısından ise % 68.1'dir. Mersin ilinde hastalık yaygınlığı ile ilgili bu değerler % 58.8 ve % 54.4 olarak rapor edilmiştir (Çolak ve Biçici, 2011).

Samsun ili ve ilçelerinde 2005 yılında yapılan diğer bir çalışmada ise domates ekiliş alanlarının % 81,2'inde kök ve kök boğazı hastalığı ile bulaşık olduğu ve hastalığın bitkilerde % 56.3 oranında yayılış gösterdiği, hastalık şiddetinin ise % 34 olduğu saptanmıştır (Erol, 2007).

Bu çalışma, Alata Bahçe Kültürleri Araştırma İstasyonu Müdürlüğü Domates Islah programları için geliştirilmiş ve ebeveyn olabilecek durumda F6 kademesindeki 450 adet domates hattının, *F. oxysporum*'a dayanıklılık sağlayan I-1 ve I-2 genleri bakımından, söz konusu genlere bağlı olarak geliştirilen SCAR ve CAPS markörleri kullanılarak dayanıklılık durumlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmada Alata Bahçe Kültürleri Araştırma İstasyonu'nda yürütülmekte olan domates ıslah programlarında verim ve bazı özellikler bakımından ön plana çıkan domates genotiplerinden seçilmiş 450 adet domates hattı, 5 adet yabancı domates genotipi ve 8 adet nematoda dayanıklılığı beyan edilmiş F₁ domates çeşidi materyal olarak kullanılmıştır. Domates yapraklarından DNA izolasyonu Doyle ve Doyle (1990)'a göre modifiye edilmiş olan CTAB metoduna göre yapılmıştır. Elde edilen DNA örnekleri % 1'lik agaroz jelde yürütülerek miktarı belirlenmiş ve 15 µL PCR reaksiyonu içerisinde 20 ng olacak şekilde eşitlenmiştir. *F. oxysporum*'a dayanıklılığın testlenmesinde Çizelge 1'de dizilimleri verilen TAO1902 (RsaI kesim enzimi ile kesildikten sonra) ile At2 primerleri (*F. oxysporum* ırk 0, I) markörleri kullanılmıştır.

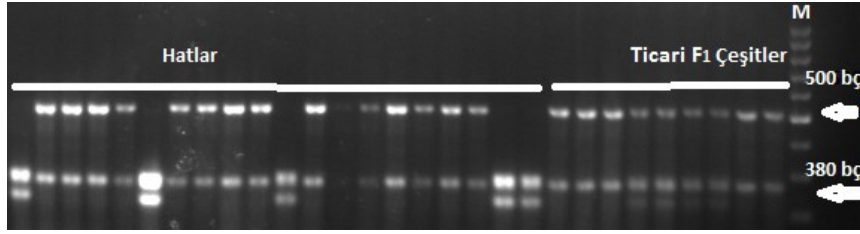
3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Moleküler düzeyde patojenle domates arasındaki interaksyonu anlamak, dominant dayanıklılık genlerini belirlemek için büyük önem arz etmektedir. Bu amaca ulaşmak için moleküler markörler birçok bitki türünün ıslahında olduğu gibi domates ıslahında da yoğun olarak kullanılan araçlardan birisidir. Özellikle hastalığa dayanıklılıkla ilişkili genlerini bulmak için en önemli kısmı olup (Grube vd., 2000; Bai vd., 2003) günümüzde PCR teknolojisinin uygulanmasına olan ilgi gittikçe artmaktadır.

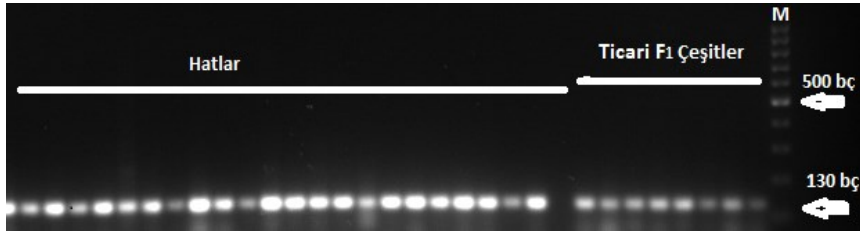
Çizelge 1. Bu çalışmada kullanılan *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* etmenine(0,1 ve 2 ırkları) karşı dayanıklılık için geliştirilmiş moleküler markörlere ait primer dizilimleri

Gen	Markör	Primer Dizini	Markör Tipi	Kaynak
I-1	At2-F3	F:CGAATCTGTATATTACATCCGTCGT	SCAR	Scott vd., 2004
	At2-R3	R:GGTGAATACCGATCATAGTCGAG		
I-2	TAO1	F: 5-GGGCTCCTAATCCGTGCTTCA-3	CAPS	Staniaszek vd., 2007
		R:5-GGTGGAGGATCGGGTTTGTTC-3		

F. oxysporum f. sp. *lycopersici*'ye dayanıklılık klasik ve MAS içeren ıslah programları ile birçok ticari çeşide aktarılmış durumdadır. Fakat bu hastalığa dayanıklı yeni çeşitlerin geliştirilmesinde moleküler markörlerin kullanımı allelik olmayan ırk-spesifik dayanıklılık genlerinin bir hatta piramitlenmesine imkan vermektedir. Domateste FOL ırklarına (0, 1, 2) dayanıklılık sağlayan dayanıklılık genlerine bağlı markörler geliştirilmiş olup rutin ıslah programlarında kullanılmaktadır. Bu çalışmada Alata Bahçe Kültürleri Araştırma İstasyonu Müdürlüğü domates gen havuzunda yer alan, verim ve bazı kalite özellikleri bakımından ön plana çıkan 450 adet domates hattında I-1 ve I-2 genlerine bağlı olarak geliştirilen SCAR ve CAPS markörleri ile tarama yapılmıştır. Domates hatlarının 88 adedinde I-1 geni (At-2-F3-R3-130 bç), 74 adedi TAO1902 markörünün kullanılması ile I-2 geni dayanıklılık alleline ait bandı üretmiştir. Her iki geni birlikte taşıyan domates hattı sayısı ise 22 adet olarak belirlenmiştir (Şekil 1, 2).



Şekil 1. TAO₉₀₂ CAPS (RsaI enzimi ile kesilmiş) markörü ile çalışmada kullanılan domates çeşit ve hatlarından elde edilen jel görüntüsü. M: Markör, Dayanıklılı (500 bç), Hassas (380 bç)



Şekil 2. At-2-F3-R3 dominant SCAR markörü ile çalışmada kullanılan domates çeşit ve hatlarından elde edilen jel görüntüsü. Dayanıklılı (130 bç)

El Mohtar vd. (2007)'nin *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ırk 2'ye dayanıklılığı sağlayan I-2 geni için geliştirilmiş markörle aynı ırka dayanıklılığı bilinen 40 adet domates genotipinin 39 adedinde bu dayanıklılığın sağlayan I-2 genine ait bant tespit edilirken bunlardan sadece 1 adet domates genotipinde söz konusu bant tespit edilememiştir. Bu metodun 3 farklı ülkede yapılan moleküler ve klasik testlemelerle yapılmış çalışmalarla geçerliliğini koruduğu bildirilmiştir. Arens vd. (2009) ise At-2-F3-R3 primer çiftini kullanarak ticari domates çeşitlerinde I-1 genine bağlı dayanıklılığı test etmiş ve söz konusu markörün I-1 geninin varlığını tespit etmede kullanılabileceğini bildirmiştir.

Bu çalışmada kullanılan domates hatları genellikle ticari F₁ domates çeşitlerinin kendilenerek F₆ kademesine getirilmiş populasyonlar ile yerel populasyonların arasından seçilen materyallerden oluşmaktadır. Genellikle ticari domates çeşitlerinin çoğu I-1 ve I-2 geninin ya birisini ya da ikisini birlikte taşımaktadır. Dolayısıyla bu çalışmadan elde edilen sonuçlar bu yolla elde edilmiş ve söz konusu hastalığa dayanıklılık amacıyla oluşturulmamış mevcut domates populasyonlarında *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*'ye dayanıklılığın belirlenmesinde yol gösterici olabilecektir.

4. SONUÇ

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* etmenine karşı dayanıklılık için geliştirilmiş moleküler markörlerin söz konusu populasyonlarda çeşit geliştirmek rahatlıkla kullanılabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*'ye karşı dayanıklılığı belirleyen moleküler markörlerin (I-1 ve I-2) söz konusu hastalığa dayanıklı çeşit geliştirmek için hazırlanacak ıslah programlarında kullanılarak daha fazla materyali değerlendirme imkanı verebilecektir. Bu da ıslah programlarının süresini kısaltacak ve başarı şansını arttırabilecektir.

Kaynaklar

Arens, P., Mansilla, C., Deinum, D., Cavellini, L., Moretti, A., Rolland, S., Schoot, H.V.D., Calvache, D., Ponz, F., Collonnier, C., Mathis, R., Smilde, D., Caranta, C., Vosman, B. 2009. Development and Evaluation of Robust Molecular Markers Linked to

- Disease Resistance in Tomato for Distinctness, Uniformity and Stability Testing. *Theor Appl Genet.*, DOI 10.1007/s00122-009-1183-2.
- Bai, Y., Huang C.C., van der Hulst, R., Meijer, D.F., Bonnema, G., Lindhout, P. 2003. QTLs for Tomato Powdery Mildew Resistance (*Oidium lycopersici*) in *Lycopersicon parviflorum* G1.1601 Co-localize with Two Qualitative Powdery Mildew Resistance Genes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16: 169–176.
- Barone, A. 2004. Molecular Marker Assisted Selection for Resistance to Pathogens in Tomato. Marker Assisted Selection: A Fast Track to Increase Genetic Gain Plant and Animal Breeding Session 1: MAS in Plants, pp: 29-35.
- Beckman, C.H. 1987. The Nature of Wilt Diseases of Plants. APS Press, St Paul, MN, 1–175.
- Bertrand C., Collard, Y., Mackill, D.J. 2008. Marker-Assisted Selection: An Approach For Precision Plant Breeding in The Twenty-First Century. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 363, 557–572.
- Çolak, A., Biçici, M. 2011. Doğu Akdeniz Bölgesi Örtü Altı Domates Yetiştiriciliğinde *Fusarium oxysporum* Spesiyal Formlarının Simptomatolojik Ayrımı ile Solgunluk ve Kök- Kök Boğazı Çürüklüğü Hastalıklarının Kök Çıkış, Şiddet ve Yaygınlıklarının Belirlenmesi. *Bitki Koruma Bülteni*, 51(4):331-345.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1990. Isolation of Plant Dna From Fresh Tissue. *Focus* 12:13-15.
- El Mohtar, C.A., Atamian, H.S., Dagher, R.B., Abou-Jawdah, Y., Salus, M.S., Maxwell, D.P. 2007. Marker-assisted Selection of Tomato Genotypes with the *I-2* Gene for Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Race 2. *Plant Dis.*, 91:758-762.
- Erol, F. Y. 2007. Samsun İlinde Kök ve Kök Boğazı Çürüklüğü Hastalığının Yayılışı, Şiddeti ve Hastalığa Neden Olan Etmenlerin Belirlenmesi. OMU Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Samsun 117 s.
- FAO, 2010. www.faostat.com.
- Frary, A., Tanksley, D. 2001: The Molecular Map of Tomato. In: R. L. Phillips, and I. K. Vasil (eds), DNA-based Markers in Plants, 2nd edn. Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants, Vol. 6, 405–420. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/ London.
- Grube, R.C., Radwanski, E.R., Jahn, M. 2000. Comparative Genetics of Disease Resistance within the Solanaceae. *Genetics*, 155: 873–887.
- Huang, C.C.H., Lindhout, P. 1997. Screening for Resistance in Wild *Lycopersicon* Species to *Fusarium oxysporum* Race 1 and Race 2. *Euphytica* 93, 145–153.
- Kumar, P., Gupta, V.K., Misra, A.K., Modi, D.R., Pandey, B.K. 2009. Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. *Plant Omics Journal* 2(4):141-162.

- Malhotra, S.K., Vashistha, R.N. 1993. Genetics of Resistance to *Fusarium* Wilt Race 1 in Current Tomato (*Lycopersicon pimpinellifolium*). *Indian J. Agric. Sci.* 63, 246–347.
- McGrath, D.J., Gillespie, G., 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.
- Scott J.W., Agrama, H.A., Jones, J.P. 2004. RFLP-based Analysis of Recombination Among Resistance Genes to *Fusarium* Wilt Races 1, 2 and 3 in Tomato. *J Amer. Soc Hortic Sci.* 129(3):394–400.
- Simons, G., Groenendijk, J., Wijbrandi, J., Reijans, M., Groenen, J., Diergaarde, P., Van der Lee, T., Bleeker, M., Onstenk, J., de Both, M., Haring, M., Mes, J., Cornelissen, B., Zabeau, M., Vos, P. 1998. Dissection of the *Fusarium* I2 Gene Cluster in Tomato Reveals Six Homologs and One Active Gene Copy. *Plant Cell* 10:1055–1068
- Stall, R.E., Walter, J.M. 1965. Selection and Inheritance of Resistance in Tomato to Isolates of Races 1 and 2 of the *Fusarium* Wilt Organism. *Phytopathology* 55, 1213–1215.
- Staniaszek, M., Kozik, E.U., 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 (2007)
- Stevens, M.A., Rick, C.M. 1986. Genetics and Breeding. In: J. G. Atherton, and J. Rudich (eds), *The Tomato Crop*, 35–109. Chapman & Hall Ltd, London.