

DOMATESTE “MARKER DESTEKLİ ISLAH (MAS)”

Cansu ŞİMŞEK^{1*}, Duran ŞİMŞEK², Nedim MUTLU³, Gamze ÇİÇEK⁴, Dilşan BOYLU⁵

¹Areo Tohumculuk, Pınarbaşı Mah., Dumlupınar Bul., No:812, Konyaaltı/Antalya; ORCID: 0000-0002-9811-3307

²Areo Tohumculuk, Pınarbaşı Mah., Dumlupınar Bul., No:812, Konyaaltı/Antalya; ORCID:

³Prof. Dr., Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji A.B.D., Konyaaltı/Antalya; ORCID: 0000-0001-7252-5883

⁴Areo Tohumculuk, Pınarbaşı Mah., Dumlupınar Bul., No:812, Konyaaltı/Antalya; ORCID:

⁵Areo Tohumculuk, Pınarbaşı Mah., Dumlupınar Bul., No:812, Konyaaltı/Antalya; ORCID:

ÖZ

Bitki biyoteknolojisi günümüz tarımsal faaliyetlerinde, özellikle bitki ıslahı alanında oldukça önem kazanmıştır. Özellikle Dünya tarımı için önemli bir materyal olan domateste gerek verim gerekse kalite açısından yoğun bir şekilde ıslah programı uygulanmaktadır. Domateste verim ve kalite kayıplarına neden olan etkenlerin başında viral, bakteriyel, ve fungal kökenli hastalıklar ve nematod gibi zararlılar gelmektedir. Bu kayıpların üstesinden gelebilmek için domates ıslahında genetik dayanıklı hibritlerin (F₁) geliştirilmesi önem arz etmektedir. Klasik ıslah sürecini hızlandırmak ve iş gücünü azaltmak adına moleküler markırların kullanılması yenilikçi bir yaklaşım olarak öne çıkmaktadır. Bu çalışmada, domateste sık görülen bakteriyel (Bakteriyel Benek), viral (Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV), Domates Sarı Yaprak Kıvrıklılığı Virüsü (TYLCV), Domates Mozaik Virüsü (ToMV)), fungal (Fusarium Solgunluğu, Vertisilyum Solgunluğu, Gri Yaprak Lekesi, Geç Yanıklık) ve nematod (Kök-ur Nematodu) kaynaklı hastalıklara karşı dayanıklılık genlerine bağlı moleküler markırların ıslah programına entegre ederek “markır destekli seleksiyon (MAS)” gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda farklı meyve türüne sahip (tekli (%42), salkım (%20), kokteyl (%18), cherry (%7), köy tipi (%8), beef (%3), plum (%2)) toplamda 2316 domates genotipi bu hastalıklara karşı dayanım durumlarının tespiti amacıyla klasik PCR ve floresan işaretli sekans-spesifik prob temelli RT-PCR (gerçek zamanlı PCR) yöntemleri ile test edilmiştir. Bu sayede domates yetiştiriciliğinde genetik dayanımın kullanılması ile daha hızlı, güvenilir ve çevre dostu bir üretim modeli anlayışına katkıda bulunulmuştur. Bu çalışma sayesinde daha hızlı, daha güvenilir ve hastalık dayanımına sahip potansiyel hibrit adaylarının geliştirilmesine katkıda bulunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Moleküler marker, bitki ıslahı, seleksiyon, PCR

“MARKER ASSISTED SELECTION (MAS)” IN TOMATO BREEDING

ABSTRACT

Plant biotechnology has gained importance in today's agricultural activities, especially in the field of plant breeding. In tomato breeding, an intensive breeding program is applied in terms of both yield and quality. Viral, bacterial, fungal pathogens, and nematodes are the leading causes of yield and quality losses in tomato cultivation. In order to overcome these losses, it is crucial to develop hybrids (F₁) that are genetically resistant to this group of diseases. The use of molecular markers stands out as an innovative approach in order to accelerate the classical breeding process and to make multi-disease resistant line development possible. In this study, “marker assisted selection (MAS)” was used to integrate molecular markers related to resistance genes against bacterial (Tomato Bacterial Speck), viral (Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV), Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV), Tomato Mosaic Virus (ToMV)), fungal (Fusarium Wilt, Fusarium Crown and Root Rot, Verticillium Wilt, Gray Leaf Spot, Late Blight) and nematode (Root Knot Nematode) diseases in tomato a commercial breeding program. In this context, a total of 2316 tomato genotypes (loose (42%), trust (20%), cocktail (18%), cherry (7%), marmande (8%), beef (3%), plum (2%)) were tested with classical PCR and fluorescently labeled sequence-specific probe-based RT-PCR (real-time PCR) methods to determine their resistance against these diseases. In this way, the use of genetic resistance in tomato cultivation has contributed to the understanding of a faster, reliable and environmentally friendly production model. This study contributed to the development of potential hybrid candidates with faster, more reliable and disease resistance.

Keywords: Molecular marker, plant breeding, selection, PCR

GİRİŞ

Birçok varyeteye sahip olan domates (*Solanum lycopersicum*) Dünya’da ve ülkemizde en çok tarımı yapılan sebzelerin başında gelmektedir. Dünyada

5.051.983 ha alanda 186.821.216 ton, Türkiye’de ise 181.879 ha alanda 13.204.015 ton domates üretimi yapıldığı kaydedilmiştir. Güney Amerika orijinli olan domates günümüzde Asya (%62.6), Amerika (%13.1), Avrupa (%12.2), Afrika (%11.9) ve

*Sorumlu yazar / Corresponding author: cansu.simsek@areo.com.tr

Okyanusya (%0.2) gibi dünyanın farklı bölgelerinde yetiştirilmektedir. Domates üretiminde ülke bazında Çin ilk sırada yer alırken, sırasıyla bunu Hindistan ve Türkiye takip etmektedir [1].

Gerek ekonomik gerekse sahip olduğu agronomik özellikleri açısından domates Dünya çapında büyük bir önem arz eden bir gıda haline gelmiştir. *Solanaceae* familyasının bir üyesi olan domates dişi ve erkek organları aynı çiçek üzerinde barındıran ve %95'e varan oranlarda kendine döllenerek tek yıllık bir bitkidir [2]. Varyete bazında fenolikler ve likopen içeriği bakımından miktarsal değişiklik gösteren domates insan sağlığı için oldukça elzem olan antioksidanları da içermektedir [3]. Genetik açıdan $2n=2x=24$ kromozoma sahip bir diploid bitki olan domates aynı zamanda kolay iklimsel adaptasyonu, diğer türlere kıyasla daha küçük olan genomu (950 Mb), ıslah açısından melezleme ve doku kültürü için rejenerasyon kolaylığı gibi özelliklerinden dolayı bilimsel çalışmalar için model bir bitkidir [4].

Domates yetiştiriciliğinde düşük maliyet ile kalite ve verimin yüksek olduğu üretim anlayışı ön plandadır. Ancak domates, ciddi verim kayıplarına sebep olabilecek 200'den fazla zararlı ve patojen türüne konakçılık yapmaktadır [5]. Bu zararlı ve patojenlerin bitkide neden olduğu hastalıklar (mantarlar, bakterileri, virüs vb. kaynaklı) şu şekilde kategorize edilmektedir: (I) bitkide neden oldukları semptomlar (kabuklar, kanserler, kök çürükleri, yaprak lekeleri vb.), (II) etkiledikleri bitki organı (kök, gövde, meyve hastalıkları vb.), (III) etkiledikleri bitki türü, (IV) patojen türü [6]. Domateste sık görülen bakteriyel (Bakteriyel Benek), viral (Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV), Domates Sarı Yaprak Kıvrıcılığı Virüsü (TYLCV), Domates Mozaik Virüsü (ToMV), fungal (Fusarium Solgunluğu, Kök ve Kök Boğazı Çürüklüğü, Vertisilyum Solgunluğu, Gri Yaprak Lekesi, Geç Yanıklık) kaynaklı hastalıklar ve nematod (Kök-ur Nematodu) zararlısı olup, bunlarla dayanım ile ilişkili olan gen bölgeleri bulunmaktadır. Bu hastalıkların başında gelen TSWV'ye Tospoviridae ailesine üye olan ve Trips vektörü ile taşınan bir virüs neden olmaktadır. Bu hastalığa karşı dayanım, domatesin 9. kromozomu üzerinde bulunan Sw-5 dominant geni ile sağlanmaktadır [7]. TYLCV'de ise Geminiviridae ailesinden ve tütün beyazsineği (*Bemisia tabaci*) ile taşınan bir virüs hastalık etmeni olup dayanım Ty-1-6 gen/genleri ile sağlanmaktadır [8, 9, 10]. ToMV'de ise dayanım Tm-1, Tm-2 ve Tm-2² gen/genleri ile sağlanmakta olup 0, 1 ve 2 ırklarının hepsine birden etkin dayanım 9. kromozom üzerinde bulunan Tm-2² geni ile sağlanmaktadır [11]. Fungal kaynaklı hastalıkların en önemlilerinden olan kök ve kök boğazı çürüklüğü *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-*

lycopersici etmeni ile meydana gelmekte olup dayanım 9. kromozom üzerinde bulunan Frl (Forl) geni ile sağlanmaktadır [12]. Bir başka *Fusarium* kaynaklı hastalık olan *Fusarium solgunluğu* ise *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* hastalık etmeni olup en önemli dayanımlar 11. kromozomda bulunan I-2 (Fol2) ve 7. kromozomda bulunan I-3 (Fol3) genleri ile sağlanmaktadır [13]. Vertisilyum solgunluğu ise bu vasküler hastalıktaki en önemli iki patojen olan *Verticillium dahliae* ve *Verticillium albo-atrum* kaynaklı olmakla birlikte dayanımı 9. kromozomda bulunan Ve1 ve Ve2 gen/genleri sağlamaktadır [14]. Gri yaprak lekeli, *Stemphyllium* spp. kaynaklı, yüksek hava sıcaklığına bağlı olarak görülen bir yaprak hastalığı olup dayanım 11. kromozom üzerinde bulunan Sm eksik baskın geni tarafından sağlanmaktadır [15]. Bir başka fungal bir hastalık olan geç yanıklıkta ise semptomlar *Phytophthora infestans* kaynaklı görülmekte olup dayanım 7. kromozomda bulunan Ph/Ph-1, 7. kromozomda bulunan Ph-2 ve 9. kromozomda bulunan Ph-3 (en etkin dayanım sağlayan gen) gen/genleri ile sağlanmaktadır [16]. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* etmeninin neden olduğu bakteriyel benek hastalığında ise dayanım 5. kromozom üzerinde bulunan Pto geni ile sağlanmaktadır [17]. Kök-ur nematodlarına (*Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*) karşı direnç ise domatesin 6. kromozomunda bulunan tek baskın Mi geni tarafından sağlanmaktadır [18].

Bu çalışmada, domateste sık görülen bakteriyel (Bakteriyel Benek), viral (TSWV (Domates Lekeli Solgunluk Virüsü), TYLCV (Domates Sarı Yaprak Kıvrıcılığı Virüsü), ToMV (Domates Mozaik Virüsü), fungal (Fusarium Solgunluğu, Vertisilyum Solgunluğu, Gri Yaprak Lekesi, Geç Yanıklık) ve nematod (Kök-ur Nematodu) kaynaklı hastalıklara karşı dayanıklılık genlerine bağlı moleküler markırların ıslah programına entegre ederek "markır destekli seleksiyon (MAS)" gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda kalite ve verimi ciddi ölçüde etkileyen bu hastalıklara karşı dayanımlar ile ilişkili olan moleküler markırların domates ıslahında kullanılması sayesinde jenerasyonlar arası kalıtılabilen özelliklerin takibi yapılabilmektedir. Bu kapsamda MAS yardımıyla hastalık/hastalıklara karşı dayanıma sahip genotiplerin belirlenmesi ve ilgili dayanımların farklı domates genotiplerine aktarılması ile potansiyel yeni çeşit adaylarının geliştirilmesi sağlanmaktadır. Ayrıca bu sayede mevcut klasik ıslah programı için harcanan süre kısaltılmakta ve ticari olarak yeni çeşitlerin farklı pazarlarda yer alması hız kazanmaktadır.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada Areo Tohumculuk'un genetik koleksiyonundan ve farklı generasyonlara ait (F₁, F₃, F₄, F₅ ve F₆) ve farklı meyve türüne sahip (tekli (%42), salkım (%20), kokteyl (%18), cherry (%7), köy tipi (%8), beef (%3), plum (%2)) toplamda 2316 domates genotipi kullanılmıştır. Analizler için gerekli DNA örnekleri %2'lik CTAB [19] metodu ile genç ve sağlıklı yapraklardan ekstrakte edilmiştir. Genotipler, domates yetiştiriciliğinde en sık görülen ve ciddi verim/kalite kayıplarına neden olan bakteriyel, fungal, viral ve nematod kökenli hastalıklara (domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV), kök-ur nematodları, domates sarı yaprak kıvrıklığı virüsü (TYLCV), kök ve kök boğazı çürüklüğü, Fusarium solgunluğu, domates mozaik virüsü (ToMV), domates mildiyözü, Vertisilyum solgunluğu, gri yaprak lekesi, geç yanıklık) karşı floresan (FAM-HEX) işaretli sekans-spesifik problemler kullanılarak RT-PCR (CFX96, BioRad) cihazı ile analiz edilmiştir. Toplamda bu hastalıklarla ilişkili 11 adet lokus (Sw5, Mi, Ty, Frl, I-2, I-3, TMV-2², Sm, Ph3, Ve1, Pto) Çizelge 1'de verilen reaksiyon şartlarına tabi tutularak amplifiye edilmiştir. Analiz esnasında ek olarak durumu bilinen ticari çeşitler kontrol olarak kullanılmıştır. Prob tasarımlarının dayanıklı alel için HEX, hassas alel için FAM işaretli şekilde yapılması göz önüne alınarak amplifikasyon sonuçları CFX Maestro programında analiz edilmiştir.

Çizelge 1. RT-PCR protokolü

Bileşen	Miktar	
DNA	2-3 µl	
Master Mix (MASGEN)	13 µl	
TOPLAM	15 µl	
95°C	2 dk.	9 döngü
95°C	20 sn.	
66°C (TouchDown)	1 dk.	
95°C	15 sn.	
Sw-5 (56°C) Ty (58°C) Mi (56°C) I-2 (57°C) I-3 (57°C) Frl (57°C) ToMV-2 ² (57°C) Ph3 (57°C) Ve1 (57°C) Sm (58°C)	1 dk.	32 döngü

Ayrıca örnekler ikinci bir yöntem olan klasik PCR yöntemi ile Ty, Sw5, Mi, I-2 ve I-3 lokusları açısından Çizelge 2'de bulunan PCR protokolüne göre (Çizelge 3'de kullanılan primerlerin sekans bilgileri yer almaktadır) testlemeler yapılmıştır. Amplifikasyon ürünleri, farklı yoğunluklardaki agaroz jellere yüklenmiş ve 100 V'da elektroforeze tabi tutulmuştur. Daha sonra agaroz jeller (EtBr

içeren) UV görüntüleme cihazında (Bio-Rad, U.S.A.) görüntülenmiştir. Sonuçlar, testte kullanılan markırların (baskın/kodominant) özelliklerine ve amplifiye edilmiş hedef bölgenin sekans uzunluğuna göre skorlanmıştır.

Çizelge 2. Klasik PCR protokolü

Bileşen	Miktar	
DNA	50-100 ng	
HOT FIREPol Blend Master Mix (Solis Biotek)	2X	
Primer-Forward	0.2 µl	
Primer-Reverse	0.2 µl	
TOPLAM	15 µl	
95°C	13 dk.	1 döngü
95°C	15 sn.	35 döngü
Her hastalık için primerlerin farklı tavlama (annealing) sıcaklıkları bulunmaktadır. Sw-5 [7] Ty-3 [8] Mi [18] I-2 [20] I-3 [13]	45 sn.	
72°C	1 dk.	
72°C	7 dk.	1 döngü

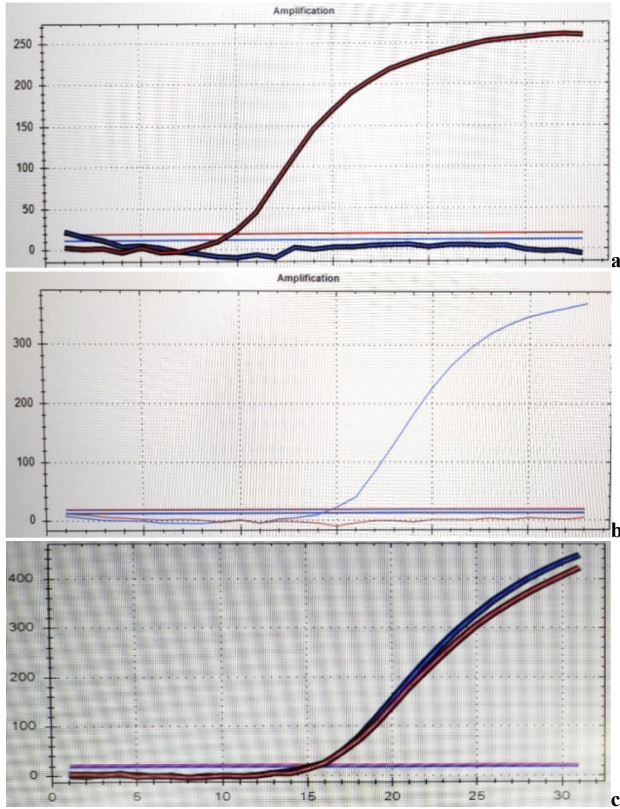
Çizelge 3. Klasik PCR'da kullanılan primerlere ait bilgiler

Lokus	Primer Adı	Forward Sekansı (5'-3')	Reverse Sekansı (5'-3')	Ta (°C)	Agaroz Jel (%)
Tsw (Sw5b)	Sw5-2	AATTAGGTTCTTG AAGCCCATCT	TTCGCGATCAGCC AATAGTGT	53	1.5
Ty-3	Ty3-25	GGTAGTGGAAT GATGCTGCTC	GCTCTGCCTATTG TCCCATATATAAC C	54	1.5
Mi2.3	Mi-23	TGGAAAAATGTT GAATTCTTTTG	GCATACTATATG GCTTGTTTACCC	57	2
I-2	Z1063	ATTTGAAAGCGT GGTATTGC	CTTAAACTCACCA TTAAATC	55	1
I-3	NC-I3-017	TTCCCTCAATCCA ACAAAAGTT	ACTCTCGAGTTCC GGTGAAA	55	1.5

BULGULAR VE TARTIŞMA

Domateste ciddi verim ve kalite kaybı meydana getiren önemli bakteri, virüs, fungus ve nematod kökenli hastalıklara karşı dayanımla ilişkili toplam 11 adet lokus (Sw5, Mi, Ty, Frl, I-2, I-3, TMV-2², Sm, Ph3, Ve1, Pto) floresan işaretli sekans-spesifik prob temelli RT-PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Toplamda 1174 adet (örnek) Sw5, 1265 adet Mi, 2100 adet Ty, 2000 adet Frl, 1081 adet I-2, 1013 adet I-3, 384 adet TMV-2², 60 adet Sm, 60 adet Ph3, 112 adet Ve1, 60 adet Pto analizi gerçekleştirilmiştir.

HEX ve FAM problemlerinin kullanıldığı yöntemde sadece HEX sinyalinin üretildiği genotipler homozigot dayanıklı, sadece FAM sinyalinin üretildiği genotipler homozigot hassas ve her iki sinyalin olduğu genotipler ise heterozigot dayanıklı olarak değerlendirilmiştir (Şekil 1-a, b, c). Farklı meyve türüne sahip domates genotipleri ile yapılan amplifikasyonların sonuçları CFX Maestro programında analiz edilmiştir.



Şekil 1. Floresan işaretli sekans-spesifik prob temelli RT-PCR analiz sonuçları. (a) HEX sinyalinin üretildiği homozigot dayanıklı genotipe ait grafik; (b) FAM sinyalinin üretildiği homozigot hassas genotipe ait grafik; (c) HEX-FAM sinyalinin üretildiği heterozigot dayanıklı genotipe ait grafik

Yapılan floresan işaretli sekans-spesifik prob temelli RT-PCR analizleri sonucunda en fazla homozigot dayanımın %83.03'lük oran ile Vertisilyum solgunluğuna karşı olduğu gözlemlenmiştir. En fazla homozigot hassas sonuç ise %89.63'lik oran ile Fusarium solgunluğunun (Fol)'nin 1, 2 ve 3. ırklarına karşı elde edilmiştir. Analize konu olan biber genotiplerinde *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol)'nin 1 ve 2 ırkına karşı dayanım (I-2) %61.33'lük oran ile 1, 2 ve 3. ırklara karşı elde edilen dayanım (I-3) oranından (%3.65) fazladır. En fazla homozigot dayanım vertisilyum solgunluğuna karşı dayanımdan sorumlu olan Ve1 geninin analizinden elde edilirken (%83.03) sonra sırası ile I-2 (%61.33), Sm (%58.33), TMV-2² (%56.25), Frl (%30.35), Mi (%28.22), Ty (%25.48), Sw-5 (%14.13), Ph3 (%5) ve I-3 (%3.65) genlerine karşı elde edilmiştir.

Domateste görülen bu hastalıklara karşı dayanımı belirlemek amacı ile mevcut literatürde bulunan çeşitli moleküler markır bilgileri yer almaktadır [20, 21]. Yapılan bu floresan işaretli sekans-spesifik prob temelli RT-PCR analizlerine alternatif olarak

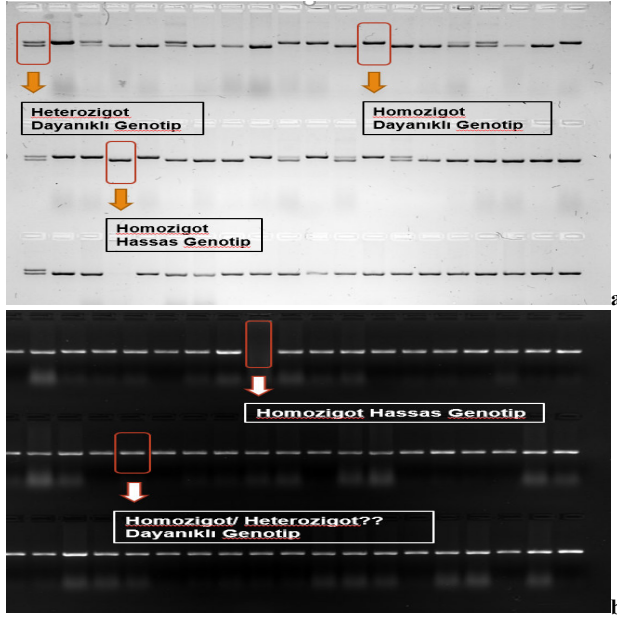
kullanılabilecek klasik-PCR için dizayn edilmiş markırların [7, 8, 13, 18, 20] güvenilirliği de aynı materyaller ile testlenmiştir. Sw-5b ve Mi2.3 genlerinin amplifikasyonu için kullanılan markırlar floresan işaretli sekans-spesifik prob temelli RT-PCR analizleri ile aynı sonuçları üretmiştir. Ancak I-2 lokusu açısından bakıldığında, klasik PCR ile elde edilen ürün eğer 940 bp'de meydana geldiyse genotip dominant dayanıklı (homozigot veya heterozigot dayanım ayırt edilemez) ve PCR ürünü elde edilememiş ise genotip homozigot hassas olarak skorlanmaktadır (Çizelge 3, Şekil 2-a). Bir hastalıkla ilgili lokusun amplifikasyonunda eğer dominant markır kullanılmış ise homozigot veya heterozigot dayanıklı genotipin ayırımı yapılamadığından dolayı ıslah açısından bir takım güçlükler meydana gelmektedir. Özellikle kendileme ile elde edilen ileri jenerasyonlarda genotipin homozigotluk/heterozigotluk durumunu bilmemek o genotipin analiz edilen özellik bakımından durulup durulmadığını belirleyememeyi de beraberinde getirmektedir. Aynı zamanda klasik PCR için kullanılan bu markır tekrarlanamayan, tutarlılık göstermeyen sonuçlar üretmiştir. Ty-3, Mi, Sw-5 ve I-3 lokuslarının analizinde kodominat markırların kullanılması sayesinde (Şekil 2-b) bu handikapların önüne geçilmekte ve sonuçların yorumlanması ile (Çizelge 3) homozigot veya heterozigot dayanıklı genotipler birbirinden ayırt edilebilmektedir.

Çizelge 3. Farklı lokusların klasik PCR ile amplifikasyonu sonucu elde edilen PCR ürünlerinin büyüklükleri

Lokus	Dayanıklı genotipe ait PCR ürünü büyüklüğü (bp)	Hassas genotipe ait PCR ürünü büyüklüğü (bp)
Ty-3	Ty-3 (450 bp), Ty-3a (630 bp), Ty-3b (660 bp)	320
Mi	380	430
Sw-5	574	510/464
I-2	940	
I-3	673	480

Aynı zamanda biber ıslahında TYLCV'ye karşı dayanım için en sık kullanılan Ty-1 geninin Ty-3, Ty-3a ve Ty-3b genlerinin alleli olduğu ve Ty-1/Ty-3 aday geni olduğu tahmin edilmektedir [22]. Ty-3 lokusuna büyük introgresyonunun Mi geninin yakınındaki Ty-1 bölgesini de kapsadığı ve bu nedenle Ty-1 ve Ty-3 direnç alellerinin olası bir şekilde bir arada var olduğunu belirlenmiştir [23]. Bu nedenle klasik PCR ile Ty-1 geni için ayrı bir testleme yapmaya ihtiyaç duyulmamıştır. I-3 için yapılan klasik PCR testlemesi [13] sonucunda ise floresan işaretli sekans-spesifik prob temelli RT-PCR analizlerinden elde edilen sonuçlar ile çelişen bazı veriler elde edilmiştir. Bu durumun ise farklı kaynaklarından gelen bazı I-3 dayanımlarını (primer

bağlanma bölgesindeki olası bir mutasyon vb. gibi olası nedenlerden dolayı) klasik-PCR yöntemi ile belirleyememekten kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 2. Klasik PCR ürünlerinin elektroforezi sonucu elde edilen UV görüntüleri. (a) Dominant markır kullanılarak amplifiye edilmiş genotiplere ait UV görüntüsü; (b) Kodominant markır kullanılarak amplifiye edilmiş genotiplere ait UV görüntüsü

Ayrıca domateste MAS'a yönelik olarak kullanılan RT-PCR ve klasik PCR yöntemi karşılaştırılacak olduğunda, RT-PCR yöntemi eş zamanlı gerçek veriler sunduğu için klasik PCR'a göre analiz süresi açısından hız kazandırmaktadır. Klasik PCR yönteminde PCR'da yapılan amplifikasyon sonucunda oluşan ürünlerin baz uzunluğu açısından ayrıştırılması amacı ile elektroforez gibi ek bir işleme tabi tutulması gerekmektedir. Bu ilave basamak gerek süre, gerekse işlem esnasında etidyum bromür (EtBr) gibi sağlık açısından tehlikeli maddelerin kullanılmasından dolayı tercih edilmeyen yönleri sahiptir. Aynı zamanda RT-PCR yönteminde farklı lokuslara yönelik farklı floresan boya ile işaretlenmiş problemlerin kullanılabilmesi sayesinde birden fazla hedef tek bir PCR reaksiyonu ile amplifiye edilebilmektedir. Bu sayede maliyet ve iş gücü açısından tasarruf sağlanmaktadır [24].

RT-PCR ile yapılan hastalık analizleri hastalık protokolüne bağlı olarak ortalama olarak 1.5 saat sürmesine karşın klasik PCR ile yapılan analizler restriksiyon işlemi yoksa 2 saat, restriksiyon işlemi varsa daha uzun saatler sürebilmektedir. Ayrıca 1-4 saat elektroforez işlemine olan gereksinim çok basamaklı işlemler ve buna bağlı olarak işçilik, uzun

sürekli elektrik tüketimine neden olmaktadır. Maliyet açısından RT-PCR ile yapılan hastalık analizleri klasik PCR yöntemine göre daha masraflı olmasına rağmen, çok fazla örnek çalışan laboratuvarlar için zaman açısından oldukça kazanım sağlamaktadır.

Sebze ıslahı stratejilerinde MAS yöntemi günümüzde oldukça yoğun olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem özellikle önde gelen ticari tohum firmaları tarafından önemli bitki hastalıklarına karşı dayanım geliştirmek için kendileme ve geri melezleme programlarında seleksiyon amaçlı kullanılmaktadır. Bir özellik için güvenilir bir belirteç (marker) mevcut olduğunda fenotipik seçimden daha büyük ilerleme ile sağlanmakta ve özelliğe bağlı olarak geleneksel seleksiyon yöntemlerinden daha güvenilir ve daha hızlı sonuç elde edilmektedir. Yapılan analizler doğrultusunda hastalık dayanımlarının belirlenmesi ile aynı çeşit aday/ıslah hattında çoklu dayanım genleri kombine edilerek “gen piramitlemesi” yine bu yöntemle hızlı bir biçimde yapılabilmektedir.

SONUÇ

Farklı domates genotiplerinde 11 farklı hastalık dayanımı ile ilişkili lokusa yönelik yapılan floresan işaretli sekans-spesifik prob temelli RT-PCR amplifikasyonu sonucunda Mendel açılımına uygun olan segregasyonlar (örneğin F₂ popülasyonu için 1:2:1 açılımı) elde edilmiştir. Analiz esnasında dayanım durumları bilinen dayanıklı ve hassas örneklerin kontrol olarak kullanılması ile yapılan analizlerin doğruluğundan emin olunmuştur.

Klasik ıslah ile moleküler markır yardımcı seleksiyonun birbirine entegre edilmesi ile klasik ıslah programlarının verimliliği önemli derecede artmıştır. MAS'ın kullanılması özellikle çoklu hastalık dayanımlı hatların geliştirilmesi amacıyla yapılan tek bitki seleksiyonları ve/veya gen piramitleme çalışmaları rutin uygulamalar durumuna gelmiştir. MAS sayesinde hastalık dayanımına sahip olmayan bitkilerin seleksiyonu fide döneminde ve erken generasyonlarda yapılabilmektedir. Islahın erken aşamalarında yapılan bu seleksiyon sayesinde zaman, iş gücü, gübreleme-ilaçlama masrafları gibi unsurlardan tasarruf sağlanmaktadır. MAS ile dayanım durumu yüksek doğrulukla belirlenmiş ve agronomik özellikleri bakımından iyi bir şekilde gözlemlenip yapılarak seçilmiş bitki materyallerinin ıslahta kullanılması ile daha hızlı potansiyel hibrit adaylarının elde edilmesi sağlanmaktadır. Çoklu hastalık dayanımlı ve rekabetçi çeşit adaylarının geliştirilmesi, firmalarımızın mevcut ülke ve uluslararası pazarlarda yer almasını ve kalıcı olmasını sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. FAO, 2020. FAO crops and livestock products (<https://www.fao.org/faostat/en/#data/qcl>; Erişim: Eylül 2022).
2. Kabaş, A., İlbi, H. 2016. Hibrit domates tohum üretimi ve teknolojisi. *Türktob Dergisi* 17:16-17.
3. Martínez-Valverde, I., Periago, M. J., Provan, G., Chesson, A. 2002. Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82(3):323-330.
4. Al-Remi, F., Arvas, Y.E., Durmuş, M., Kaya, Y. 2018. Domates bitkisi ve *in vitro* mikro çoğaltımı. *J. Engineering Tech. and Appl. Sci.* 3(1):57-73.
5. Heusden, S. van, Lindhout, P. 2018. Tomatoes. In: E. Heuvelink (Ed.): *Genetics and breeding*, CABI International, Boston, USA. 35p.
6. Yialouris, C.P., Sideridis, A.B. 1996. An expert system for tomato diseases. *Computers and Electronics in Agriculture* 14(1):61-76.
7. Dianese, E.C., de Fonseca, M.E.N., Goldbach, R., Kormelink, R., Inoue-Nagata, A.K., Resende, R.O., Boiteux, L.S. 2010. Development of a locus-specific, co-dominant SCAR marker for assisted-selection of the Sw-5 (Tospovirus resistance) gene cluster in a wide range of tomato accessions. *Molecular Breeding* 25(1):133-142.
8. Ji, Y., D.J. Schuster, J.W. Scott, 2007. Ty-3, a begomovirus resistance locus near the Tomato yellow leaf curl virus resistance locus Ty-1 on chromosome 6 of tomato. *Molecular Breeding* 20(3):271-284.
9. Hutton, S.F., Scott, J.W., Schuster, D.J. 2012. Recessive Resistance to Tomato yellow leaf curl virus from the Tomato Cultivar Tyking Is Located in the Same Region as Ty-5 on Chromosome 4, *HortScience* 47(3):324-327.
10. Caro, M., M.G. Verlaan, O. Julián, R. Finkers, A.M.A. Wolters, S.F. Hutton, J.W. Scott, R. Kormelink, R.G.F. Visser, M.J. Diez, A. Perez de Castro, Y. Bai, 2015. Assessing the genetic variation of Ty-1 and Ty-3 alleles conferring resistance to tomato yellow leaf curl virus in a broad tomato germplasm. *Molecular Breeding* 35(6):1-13.
11. Hall, T.J. 1980. Resistance at the TM-2 locus in the tomato to tomato mosaic virus. *Euphytica* 29:189-197.
12. Fazio, G., M.R. Stevens, J.W. Scott, 1999. Identification of RAPD markers linked to Fusarium crown and root rot resistance (Frl) in tomato. *Euphytica* 105(3):205-210.
13. Zhang, J., Panthee, D.R. 2021. Development of codominant SCAR markers to detect the Pto, Tm22, I3 and Sw5 genes in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Breeding* 140(2):342-348.
14. Panthee, D.R., Chen, F. 2010. Genomics of fungal disease resistance in tomato. *Current Genomics* 11(1):30-39.
15. Su, X., Zhu, G., Huang, Z., Wang, X., Guo, Y., Li, B., Du, Y., Yang, W., Gao, J. 2019. Fine mapping and molecular marker development of the Sm gene conferring resistance to gray leaf spot (*Stemphylium* spp.) in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(4):871-882.
16. Chunwongse, J., Chunwongse, C., Black, L., Hanson, P. 2002. Molecular mapping of the Ph-3 gene for late blight resistance in tomato. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 77(3):281-286.
17. Pedley, K.F., Martin, G.B. 2003. Molecular basis of Pto-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. *Annual Review of Phytopathology* 41(1):215-243.
18. Seah, S., Williamson, V.M., Garcia, B.E., Mejia, L., Salus, M.S., Martin, C.T., Maxwell, D.P. 2007. Evaluation of a co-dominant SCAR marker for detection of the Mi-1 locus for resistance to root-knot nematode in tomato germplasm. *Tomato Genetic Cooperative Report*, 57:37-40.
19. Doyle, J.J. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
20. Arens, P., C. Mansilla, D. Deinum, L. Cavellini, A. Moretti, S. Rolland, van der H. Schoot, D. Calvache, F. Ponz, C. Collonnier, R. Mathis, D. Smilde, C. Caranda, B. Vosman, 2010. Development and evaluation of robust molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness, uniformity and stability testing. *Theoretical & Applied Genetics* 120(3):655-664.
21. Foolad, M.R., Panthee, D.R. 2012. Marker-Assisted Selection in Tomato Breeding, *Critical Reviews in Plant Sciences* 31(2):93-123.
22. Verlaan, M.G., S.F. Hutton, R.M. Ibrahim, R. Kormelink, R.G.F. Visser, J.W. Scott, J.D. Edwards, Y. Bai 2013. The tomato yellow leaf curl virus resistance genes Ty-1 and Ty-3 are allelic and code for DFDGD-class RNA-dependent RNA polymerases. *PLoS genetics*, 9(3):e1003399.
23. Ji, Y., Schuster, D.J., Scott, J.W. 2007. Ty-3, a begomovirus resistance locus near the Tomato yellow leaf curl virus resistance locus Ty-1 on chromosome 6 of tomato. *Molecular Breeding* 20:271-284.
24. Gurvich, O.L., Skoblov, M. 2011. Real-time PCR and multiplex approaches. In: O'Driscoll, L. (eds) *Gene Expression Profiling. Methods in Molecular Biology*, Vol:784. Humana Press.