

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Zübeyir DEVRAN

**HIYARDA KÖK-UR NEMATODLARINA KARŞI MOLEKÜLER
MARKIRLARIN GELİŞTİRİLMESİ**

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA, 2006

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HIYARDA KÖK-UR NEMATODLARINA KARŞI MOLEKÜLER
MARKIRLARIN GELİŞTİRİLMESİ**

Zübeyir DEVRAN

DOKTORA TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Bu tez 28/03/2006 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği İle Kabul Edilmiştir.

İmza.....

Prof. Dr. İ. Halil ELEKÇİOĞLU
DANIŞMAN

İmza.....

Prof. Dr. N. Kemal KOÇ
ÜYE

İmza.....

Prof. Dr. H. Avni ÖKTEM
ÜYE

İmza.....

Prof. Dr. Nebahat SARI
ÜYE

İmza.....

Yrd. Doç. Dr. Galip KAŞKAVALCI
ÜYE

**Bu tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:**

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü

**Bu Çalışma Ç. Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve TÜBİTAK NATO-A2 Yurt Dışı
Araştırma Bursu Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No : FBE2002D203**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

HIYARDA KÖK-UR NEMATODLARINA KARŞI MOLEKÜLER MARKIRLARIN GELİŞTİRİLMESİ

Zübeyir DEVRAN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. İbrahim Halil ELEKÇİOĞLU

Yıl : 2006, Sayfa : 116

Jüri : Prof. Dr. İbrahim Halil ELEKÇİOĞLU

Prof. Dr. Namık Kemal KOÇ

Prof. Dr. Hüseyin Avni ÖKTEM

Prof. Dr. Nebahat SARI

Yrd. Doç. Dr. Galip KAŞKAVALCI

Bu çalışmada Kök-ur nematodlarına (*M. arenaria* ırk 1 ve ırk 2; *M. javanica*; *M. hapla*) dayanıklı olan Lucia, Shelby ve Manteo rekombinant inbred hatları ile duyarlı olan Batem1 ve Batem2 saf hatları melezlenerek F₁ bitkileri, F₁'ler de kendilenecek F₂ bitkileri elde edilmiştir. Ebeveynler, F₁ ve F₂ bitkileri *M. javanica* ırk 1 ile test edilerek dayanıklı ve duyarlı bireyler belirlenmiştir. *M. javanica* ırk 1 ile test edilen F₂ bireylerinin 3:1 (3 duyarlı, 1 dayanıklı) açılım gösterdiği ve dayanıklılığın resesif tek gen tarafından kontrol edildiği belirlenmiştir.

Dayanıklılık sağlayan *mj* genine bağlı moleküler markır geliştirmek için, RAPD (37 adet primer), SCAR (14 adet primer), SSR (23 adet primer), AFLP (100 adet EcoRI-MseI primer) ve SRAP (112 adet primer) markırları kullanılmıştır. 37 adet RAPD primerinden 11 tanesinden PCR ürünü elde edilmemiş, 26 tanesinden ise PCR ürünü elde edilmiş fakat ebeveynler arasında polimorfizm belirlenememiştir. 14 adet SCAR primerinden 7 tanesinden PCR ürünü elde edilmiş ancak ebeveynler arasında polimorfizm gözlemlenmemiştir. 23 adet SSR primeri kullanılmış ve bunlardan bir tanesi ebeveynler arasında polimorfizm vermiş fakat *mj* geni ile bağlantılı olmadığı belirlenmiştir. 100 adet AFLP primerinden 92 tanesinde PCR ürünü elde edilmiş ve bunlardan 2 tane primer kombinasyonu (E-ATT/M-CAA ve E-AAC/M-CTG) *mj* genine bağlı olduğu belirlenmiştir. Bu iki DNA bandı poliakrilamid jelden kesilmiş, klonlanmış ve dizilim analizi yapılmıştır. Dizilim analizleri kullanılarak geliştirilen primerler dayanıklı ve duyarlı ebeveynlerde PCR yapılmış fakat ebeveynler arasında polimorfizm görülmemiştir. E-ATT/M-CAA AFLP primer kombinasyonu dayanıklı ve duyarlı ebeveynler arasında dizilim farklılığı vermiştir. Bu dizilim farklılığı herhangi bir enzim tanıma bölgesine sahip olmadığından CAPS'a çevrilememiş ve ebeveynler birbirlerinden ayırlanamamıştır.

AFLP markır sistemiyle geliştirilen hıyar genomuna ait 4 adet seçici primer (D1F, D1R, D17F, D17R) SRAP forward ve reverse primerleriyle birlikte PCR yapılarak ebeveynler arasında farklılık araştırılmıştır. 11 adet primer kombinasyonu ebeveynler arasında polimorfizm vermiş olup bunlar F₂ bireylerinde taranmıştır. MAPMAKER/EXP Version 3.0 programı kullanılarak yapılan analizde bunlar içerisinde iki tane markırın *mj* genine 16.3 cM ve 19.3 cM uzaklıkta olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hıyar, *Meloidogyne javanica* ırk 1, dayanıklılık, *mj* geni, moleküler markırlar

ABSTRACT

PhD THESIS

DEVELOPMENT OF MOLECULAR MARKERS FOR ROOT-KNOT NEMATODE RESISTANCE IN CUCUMBER

Zübeyir DEVRAN

DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor : Prof. Dr. İbrahim Halil ELEKÇİOĞLU

Year : 2006, Pages : 116

Jury : Prof. Dr. İbrahim Halil ELEKÇİOĞLU

Prof. Dr. Namık Kemal KOÇ

Prof. Dr. Hüseyin Avni ÖKTEM

Prof. Dr. Nebahat SARI

Assist. Prof. Dr. Galip KAŞKAVALCI

In this study, segregating F₂ populations were obtained from crosses of *M. arenaria* race 1, race 2, *M. incognita*, *M. hapla* resistant recombinat inbred lines Lucia, Shelby and Manteo with susceptible lines Batem1 and Batem2. F₂ individuals were phenotyped with *M. javanica* race 1 in a test including parents and F₁ plants of the corresponding crosses. Resistance segregated 1:3 in F₂ populations, indicating the presence of an recessive resistance gene.

In order to determine molecular markers linked to *mj* gene, 37 RAPD, 14 SCAR, 23 SSR, 100 AFLP (EcoRI-MseI) and 112 SRAP were used to screen the parents for polymorphism. 26 of the 37 RAPD resulted with amplification product but none were polymorphic. Similarity, 7 of the 14 SCAR gave bands but none were polymorphic. 23 SSR primers with known map locations were used to screen parents. Only one gave polymorphism but it was not linked to *mj* gene. Of the 100 AFLP primers, 92 produced bands and two yielded candidate markers (E-ATT/M-CAA ve E-AAC/M-CTG) linked to *mj* gene. These two bands were cut of polyacrylimide gel, cloned and sequence analysed. Primers designed from the sequences did not yield polymorphic bands between parents. In addition, the sequences did not contain any restriction site which could have been used to convert them to CAPS markers.

The two sequences obtained from AFLP polymorphic marker were used primarily to design D1F, D1R, D17F and D17R primers. SRAP forward and reverse primers were used in combination with these four specific primers to search for polymorphism between parents. Of the 112 primer combination 11 yielded polymorphism between parents and F₂ individuals were screened with these markers. MapMaker Exp 3.0 software was used to analyze the 11 markers. Two markers linked to *mj* gene 16.3 cM and 19.3 cM.

KeyWords: Cucumber, *Meloidogyne javanica* race 1, resistance, *mj* gene, molecular markers

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada, moleküler markırlar (RAPD, SCAR, AFLP, SRAP ve SSR) kullanılarak hıyarda kök-ur nematodlarına karşı dayanıklılığı sağlayan *mj* genine bağlı markırların geliştirilmesi araştırılmıştır.

Bu çalışma sırasında her türlü desteği sağlayan ve yönlendiren danışmanım Prof. Dr. İ. Halil ELEKÇİOĞLU'na (Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, ADANA); tez izleme sırasındaki değerli katkılarından dolayı Prof. Dr. Hüseyin Avni ÖKTEM (Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, ANKARA) ve Prof. Dr. Namık Kemal KOÇ'a (Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, ADANA); çalışmanın ıslah kısmını yürüten Ziraat Mühendisi Ahmet Fikret FIRAT'a (Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, ANTALYA); testleme çalışmalarım sırasındaki katkılarından dolayı Dr. Mehmet Ali SÖĞÜT (Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, ISPARTA) ve Ziraat Yüksek Mühendisi Adem ÖZASLANDAN'a (Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü, ADANA); tez basımı sırasındaki yardımlarından dolayı Araştırma Görevlisi Şenol YILDIZ'a (Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, ADANA); araştırmanın AFLP, klonlama ve sekans çalışmaları sırasında laboratuvar imkânlarını sunan ve değerli katkılarından dolayı Dr. Mahmut TÖR'e (Warwick University, HRI, UNITED KINGDOM); AFLP markır sonuçlarının değerlendirilmesinde katkıda bulunan Dr. Volkan ÇEVİK'e (Warwick University, HRI, UNITED KINGDOM); markırların haritalanması ve analizi, SRAP markırlarının kullanımı ve tezin yazımındaki değerli katkılarından dolayı Dr. Nedim MUTLU'ya (Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, ANTALYA); tezi titizlikle okuyan ve gerekli düzeltmelerde bulunan Ziraat Mühendisi İlyas TEKŞAM'a (Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, ANTALYA); moleküler çalışmalarım sırasında aynı laboratuvarı paylaştığım arkadaşlarım Dr. Münevver GÖÇMEN (Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, ANTALYA), Ziraat Yüksek Mühendisi Hatice İKTEN (Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, ANTALYA) ve Dr. İlknur POLAT'a (Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, ANTALYA) çok teşekkür ediyorum.

Bu çalışmada projeyi destekleyen Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine, AFLP, klonlama ve sekans çalışmaları için 6 ay süreyle Yurt Dışı Araştırma Bursu (NATO-A2) desteği sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK, ANKARA), alışma imkânı sunan Enstitü Yönetimine, Bitki Koruma ve Sebzeçilik Bölümünü Başkanlarına teşekkür ederim.

Eğitimim sırasında maddi ve manevi katkılarından dolayı sevgili anneme ve babama teşekkür etmeyi bir borç biliyorum.

Tez alışmaları ve yazımı sırasında çok ihmal ettiğim ve yeterli zaman ayıramadığım sevgili eşim Yasemin DEVRAN'a ve biricik kızım Sevde Tuğba DEVRAN'a sabırlarından ve desteklerinden dolayı sonsuz teşekkür ediyorum.

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	V
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	6
2.1. Kök-Ur Nematodlarıyla İlgili Çalışmalar.....	6
2.1.1. Kök-Ur Nematodlarının Yaygınlıkları, Konukçuları ve Zararları.....	6
2.1.2. Hıyarda Kök-Ur Nematodlarına Karşı Dayanıklılık Çalışmaları.....	9
2.2. Moleküler Markır Sistemleriyle İlgili Çalışmalar.....	11
2.2.1. Genetik Çeşitlilikte Moleküler Markırlarının Kullanılması.....	11
2.2.2. Dayanıklılık Çalışmalarında Moleküler Markırlarının Kullanılması...	12
2.2.3. Hıyarda Moleküler Markırların Kullanılması.....	17
3. MATERYAL VE METOT.....	21
3.1. Materyal.....	21
3.2. Metot.....	21
3.2.1. Dayanıklı ve Duyarlı Bitkiler Arasında Melezleme Çalışmaları.....	21
3.2.2. <i>Meloidogyne javanica</i> Irk 1 Saf Kültürünün Oluşturulması	22
3.2.3. Ebeveynler, F ₁ ve F ₂ Bitkilerinin <i>M. javanica</i> Irk 1 İle Testlenmesi....	22
3.2.4. Kök Uylanma Oranının Belirlenmesi.....	22
3.2.5. Yumurta Kümesi Sayısının Belirlenmesi	23
3.2.6. Genin (<i>mj</i>) Kalıtımı	23
3.2.7. Moleküler Çalışmalar	23
3.2.7.1. Bitkilerden DNA İzolasyonu	23
3.2.7.2. Bulk Segregant Analysis	24
3.2.7.3. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).....	24
3.2.7.4. Sequence Characterized Amplified Region DNA (SCAR)....	25
3.2.7.5. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP).....	27

3.2.7.5.(1). DNA'nın Enzimlerle Kesimi.....	27
3.2.7.5.(2). Adaptörlerle Birleştirme	27
3.2.7.5.(3). Ön PCR.....	28
3.2.7.5.(4). Primerlerin İşaretlenmesi.....	29
3.2.7.5.(5). Seçici PCR	29
3.2.7.5.(6). Poliakrilamid Jel Elektroforez.....	32
3.2.7.5.(7).Gene (<i>mj</i>) Bağlı Olduğu Düşünülen AFLP Markırlarının Belirlenmesi.....	32
3.2.7.5.(8). Markırların Poliakrilamid Jelden Kesilmesi ve DNA'ların Elde Edilmesi.....	32
3.2.7.5.(9). Markırların PCR'ı ve Klonlanması.....	33
3.2.7.5.(10).Markırların Sekanslarının Yapılması ve Primerlerin Oluşturulması.....	35
3.2.7.5.(11). PCR Ürünlerinin Sekanslarının Yapılması ve Yeni Primerlerin Oluşturulması.....	36
3.2.7.5.(12).Dizilim Farklılığından Yararlanılarak Geliştirilen Primerler İle PCR.....	37
3.2.7.5.(13). Geliştirilen ve Seçici AFLP Primerleriyle PCR..	39
3.2.7.6. Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP).....	40
3.2.7.7. Markırların Analizi.....	42
3.2.7.8. Simple Sequence Repeat (SSR).....	43
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	45
4.1. Ebeveynler Arasında Melezleme Çalışmaları.....	45
4.2. <i>M. javanica</i> Irk1 Saf Kültürünün Oluşturulması	45
4.3. Ebeveynler, F ₁ ve F ₂ Bireylerinin <i>M. javanica</i> Irk1 İle Testlenmesi.....	45
4.4. <i>mj</i> Geninin Kalıtımı	52
4.5. RAPD Moleküler Markır Bulguları.....	53
4.6. RAPD Moleküler Markır Tartışma.....	57
4.7. SCAR Moleküler Markır Bulguları.....	60
4.8. SCAR Moleküler Markır Tartışma.....	62
4.9. AFLP Moleküler Markır Bulguları.....	64

4.9.1. DNA'ların Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi.....	64
4.9.2. Kesilen DNA'ların Adaptörlerle Birleştirilmesi.....	65
4.9.3. Ön PCR.....	65
4.9.4. Primerlerin İşaretlenmesi.....	66
4.9.5. Seçici PCR.....	67
4.9.6. Poliakrilamid Jel Analizi.....	67
4.9.7. Bulked Segregant Analysis.....	68
4.9.8. Gene (<i>mj</i>) Bağlı Olduğu Düşünülen AFLP Markırlarının Belirlenmesi.....	69
4.9.9. Markırların Klonlanması, Sekanslarının Yapılması ve Primerlerin Oluşturulması.....	73
4.9.10. Geliştirilen ve Seçici AFLP Primerleriyle PCR.....	79
4.10. AFLP Moleküler Markır Tartışma.....	81
4.11. SRAP Moleküler Markır Bulguları.....	83
4.12. SRAP Moleküler Markır Tartışma.....	89
4.13. SSR Moleküler Markır Bulguları.....	92
4.14. SSR Moleküler Markır Tartışma.....	93
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	96
6. KAYNAKLAR.....	100
ÖZGEÇMİŞ.....	116

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

AFLP	Amplified fragment length polymorphism
AgNO₃	Gümüş nitrat
BSA	Bulk segregant analysis
CAPS	Cleaved amplified polymorphic sequence
cM	centiMorgan
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	Ethidium bromide
Kb	Kilo base
MAS	Marker aided selection
PCR	Polymerase chain reaction
QTL	Quantitative trait loci
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
RIL	Rekombinant inbred line
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SCAR	Sequence characterized amplified region
SRAP	Sequence related amplified polymorphism
SSR	Simple sequence repeat
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TBE	Tris-Borate-EDTA
TE	Tris-EDTA
TSWV	Tomato spotted wilt virus
UPGMA	Unweighted pair group method average
UV	Ultraviolet

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1.	Çalışmada kullanılan materyaller ve özellikleri	21
Çizelge 3.2.	RAPD primerleri ve dizilimleri	24
Çizelge 3.3.	SCAR primerleri ve dizilimleri (Horejsi ve ark., 1999).....	26
Çizelge 3.4	AFLP primerleri ve dizilimleri (E: EcoRI primer, M: MseI primer)	31
Çizelge 3.5	SRAP primerleri ve dizilimleri (Budak ve ark., 2004).....	41
Çizelge 3.6.	SSR primerleri ve dizilimleri (Danin-Poleg ve ark., 2001).....	43
Çizelge 4.1.	Duyarlı ebeveynlerin <i>M. javanica</i> ırk 1 ile testlenmesi sonucu köklerde oluşan ur indeksi ve yumurta kümesi sayıları.....	46
Çizelge 4.2.	Dayanıklı ebeveynlerin <i>M. javanica</i> ırk 1 ile testlenmesi sonucu köklerde oluşan ur indeksi ve yumurta kümesi sayıları..	47
Çizelge 4.3.	Dayanıklı ve duyarlı ebeveynlerin melezlemeleri sonucu elde F ₁ bireylerin <i>M. javanica</i> ırk 1 ile testlenmesi sonucu köklerde oluşan ur indeksi ve yumurta kümesi sayıları.....	48
Çizelge 4.4.	F ₂ bireylerinin (Lucia x Batem1) <i>M. javanica</i> ırk 1 ile testlenmesi sonucu köklerde oluşan ur indeksi ve yumurta kümesi sayıları.....	49
Çizelge 4.5.	F ₂ bireylerinin (Shelby x Batem2) <i>M. javanica</i> ırk 1 ile testlenmesi sonucu köklerde oluşan ur indeksi ve yumurta kümesi sayıları.....	50
Çizelge 4.6.	F ₂ bireylerinin (Manteo x Batem2) <i>M. javanica</i> ırk 1 ile testlenmesi sonucu köklerde oluşan ur indeksi ve yumurta kümesi sayıları.....	51
Çizelge 4.7.	Ebeveynlerin, F ₁ ve F ₂ bireylerinin <i>M. javanica</i> ırk 1 ile testleme sonuçları.	52
Çizelge 4.8.	Çalışmada kullanılan RAPD primerleri ve PCR sonuçları.....	53
Çizelge 4.9.	Çalışmada kullanılan SCAR primerleri ve PCR sonuçları.....	60
Çizelge 4.10.	SRAP-AFLP-primer konbinasyonları.....	85

Çizelge 4.11.	Markırların <i>mj</i> genine olan uzaklıkları.....	89
Çizelge 4.12.	SSR primerlerinin standart agaroz ve SFR agarozdaki PCR sonuçları.....	92

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 4.1.	A08, C01 ve D03 primerleriyle elde edilen PCR ürünleri Markır (1 kb), R: Dayanıklı ebeveyn (Lucia), S : Duyarlı ebeveyn (Batem1)	54
Şekil 4.2.	G06 RAPD primerleriyle elde edilen PCR ürünleri. M: Markır (1 kb), R: Dayanıklı ebeveyn (Lucia), S : Duyarlı ebeveyn (Batem1).....	54
Şekil 4.3.	A01, A05, A07 ve A17 RAPD primerleriyle elde edilen PCR ürünleri M: Markır (1 kb), R: Dayanıklı ebeveyn (Lucia), S : Duyarlı ebeveyn (Batem1).....	55
Şekil 4.4.	C06 RAPD primerleriyle elde edilen PCR ürünleri M: Markır (1 kb), R: Dayanıklı ebeveyn (Lucia), S : Duyarlı ebeveyn (Batem1)	55
Şekil 4.5.	Q05 RAPD primeriyle elde edilen PCR ürünleri. R: Dayanıklı ebeveyn (Lucia), S : Duyarlı ebeveyn (Batem1)	56
Şekil 4.6.	J04, J11, Q05, V12 ve B20 RAPD primerleriyle elde edilen PCR ürünleri M. Markır, R: Dayanıklı ebeveyn (Lucia), S: Duyarlı ebeveyn (Batem1)	57
Şekil 4.7.	SCAN5 SCAR primeriyle elde edilen PCR ürünleri M: Markır, R: Dayanıklı ebeveyn, S: Duyarlı ebeveyn.....	61
Şekil 4.8.	SCL18 SCAR primeriyle elde edilen PCR ürünleri M: Markır, R: Dayanıklı ebeveyn, S: Duyarlı ebeveyn.....	61
Şekil 4.9.	SCAI14 SCAR primeriyle elde edilen PCR ürünleri. M: Markır, R: Dayanıklı ebeveyn, S: Duyarlı ebeveyn.....	62
Şekil 4.10.	Ön PCR ürünleri M: Markır, R: Dayanıklı ebeveyn, S: Duyarlı ebeveyn.....	66

Şekil 4.11.	E-TCC/M-CTT primer kombinasyonlarıyla elde edilen AFLP bantları R: Dayanıklı ebeveyn (Lucia), S: Duyarlı ebeveyn (Batem1) R _B : Dayanıklı havuz, S _B : Duyarlı havuz.....	70
Şekil 4.12.	E-ATT/M-CAA primer kombinasyonlarıyla elde edilen AFLP bantları R: Dayanıklı ebeveyn (Lucia), S: Duyarlı ebeveyn (Batem1) R _B : Dayanıklı havuz, S _B : Duyarlı havuz.....	71
Şekil 4.13.	E-AAC/M-CTG primer kombinasyonlarıyla elde edilen AFLP bantları R: Dayanıklı ebeveyn (Lucia), S: Duyarlı ebeveyn (Batem1) R _B : Dayanıklı havuz, S _B : Duyarlı havuz.....	72
Şekil 4.14.	Poliakrilamid jelden elde edilen DNA'ların seçici PCR M. Marker, RF ₂ : Dayanıklı F ₂ bireyleri, SF ₂ : Duyarlı F ₂ bireyleri	73
Şekil 4.15.	Klonlanan ürünlerin EcoRI enzimiyle kesimi M: Markır.....	74
Şekil 4.16.	Klonlanan ürünlerin EcoRI enzimiyle kesimi M: Markır.....	75
Şekil 4.17.	Klonlanan ürünlerin EcoRI enzimiyle kesimi M: Markır.....	75
Şekil 4.18.	Klonlanan ürünlerin EcoRI enzimiyle kesimi M: Markır.....	75
Şekil 4.19.	D1F ve D1R primerleriyle elde edilen PCR ürünleri. R: Dayanıklı ebeveyn (Lucia), S: Duyarlı ebeveyn (Batem1) ...	76
Şekil 4.20.	D17F ve D17R primerleriyle elde edilen PCR ürünleri R: Dayanıklı ebeveyn (Lucia), S: Duyarlı ebeveyn (Batem1) ...	77
Şekil 4.21.	Dizayn edilen primerlerle elde edilen PCR ürünleri M: Markır (1 kb), L: Lucia, M: Manteo, B1: Batem1, B2: Batem2, H: Su. A Profili: D1F-D1R, B Profili: D1F-ZRR, C Profili: D1F-ZSR.	78
Şekil 4.22.	D1F/E-ATT primerleriyle elde edilen PCR ürünleri M: Markır (1 kb), R: Dayanıklı ebeveyn S: Duyarlı ebeveyn.....	79
Şekil 4.23.	D1R/M-CAA primerleriyle elde edilen PCR ürünleri M: Markır (1 kb), R: Dayanıklı ebeveyn S: Duyarlı ebeveyn...	80
Şekil 4.24.	D1R/E-ATT (A) ve D1F/M-CAA (B) primerleriyle PCR M: Markır (1 kb), R: Dayanıklı ebeveyn S: Duyarlı ebeveyn...	80

Şekil 4.25.	D1R-Em4 primer kombinasyonu ile elde edilen PCR ürünleri M: Markır (1 kb), L: Lucia, B: Batem1, R ve S: F ₂ bireyleri.....	86
Şekil 4.26.	D1F-Em3 primer kombinasyonu ile elde edilen PCR ürünleri M: Markır (1 kb), L: Lucia, B: Batem1, R ve S: F ₂ bireyleri....	86
Şekil 4.27.	D1F-Me7 primer kombinasyonu ile elde edilen PCR ürünleri M: Markır (1 kb), L: Lucia, B: Batem1, R ve S: F ₂ bireyleri....	87
Şekil 4.28.	D1R-Em14 primer kombinasyonu ile elde edilen PCR ürünleri, M: M: Markır (1 kb), L: Lucia, B: Batem1, R ve S: F ₂ bireyleri	87
Şekil 4.29.	D17R-Em10 primer kombinasyonu ile elde edilen PCR ürünleri M: Markır (1 kb), L: Lucia, B: Batem1, R ve S: F ₂ bireyleri	88
Şekil 4.30.	D17R-Me10 primer kombinasyonu ile elde edilen PCR ürünleri M: Markır (1 kb) L: Lucia, B: Batem1, R ve S: F ₂ bireyleri.....	88
Şekil 4.31.	Standart Agaroza CMCTT144 SSR primeri ile elde edilen PCR ürünleri.....	93
Şekil 4.32.	SFR agaroza CMCTT144 SSR primeri ile elde edilen PCR ürünleri.....	93

1. GİRİŞ

Türkiye’de 1.048.803 hektar alanda, 25.395.111 ton sebze üretimi yapılmakta olup, bunun % 81’lik kısmını meyvesi yenen sebzeler (domates, karpuz, kavuz, hıyar, biber, patlıcan, fasülye vb) oluşturmaktadır. Hıyar, yıllık 1.725.000 ton ürün kapasiteyle, domates (9.700.000 ton), karpuz (3.800.000 ton) ve biberin (1.745.000 ton) ardından dördüncü gelmektedir (FAO, 2005).

Ülkemizde sebze yetiştiriciliğinin yoğun yapıldığı bölgelerde (Akdeniz, Ege, ve Marmara) ekonomik düzeyde verim ve kalite kayıplarına neden olan birçok hastalık ve zararlı etmen bulunmaktadır. Kök-ur nematodları (*Meloidogyne* spp.) bunların içerisinde en önemlilerindendir. Bitkilerin köklerinde irili-ufaklı ur oluşturmaları ile tanınabilen Kök-ur nematodları, bitki paraziti nematodlarının en önemli gruplarını oluşturmakta olup, dünyada 80 türü tespit edilmiştir (Siddiqi, 2000). Dünyanın tropik ve subtropik iklim bölgelerinde yürütülen araştırmalarda ekonomik öneme sahip dört Kök-ur nematod türü (*M. incognita* Chitwood 1949, *M. javanica* Chitwood 1949, *M. arenaria* Chitwood 1949 ve *M. hapla* Chitwood 1949) bulunmuştur (Netscher ve Sikora, 1990). Bununla birlikte üzerinde beslendiği konukçuya bağlı olarak konukçu ırkları ve çok sayıda virülent-avirülent populasyonları belirlenmiştir (Decker ve Fritzsche, 1991; Xu ve ark, 2000). Türkiye’de yapılan çalışmalarda ise *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla* ve *M. thamesi*’nin bulunduğu, *M. incognita* ve *M. javanica*’nın en yaygın türler olduğu, *M. arenaria* ve *M. hapla*’nın ise ender rastlanan türler olduğu bildirilmektedir (Yüksel, 1974; Elekçioğlu ve Uygun, 1994; Elekçioğlu ve ark, 1994; Mennan ve Ecevit, 1996; Söğüt ve Elekçioğlu, 2000). Ayrıca Türkiye’de Kök-ur nematod türlerinin ırklarını belirlemek amacıyla yürütülen çalışmalarda, Doğu Akdeniz Bölgesi’nde *M. javanica*’ya ait 1 tane (ırk 1), *M. incognita*’ya ait 2 tane (ırk 2 ve ırk 4) olmak üzere toplam 3 tane Kök-ur nematod ırkı (Söğüt ve Elekçioğlu, 2000), Bafra ve Çarşamba ovalarında ise *M. incognita*’ya ait 1 tane ırk (ırk 2) belirlenmiştir (Mennan ve Ecevit, 2001).

Tarım alanlarında Kök-ur nematodlarıyla mücadele genel olarak; ekim nöbeti, solarizasyon, kimyasal mücadele ve dayanıklı çeşitlerin kullanılması ile yapılmaktadır (Young, 1992; Roberts, 1992; Sijmons ve ark. 1994; Gheysen ve ark,

1996; Tzortzakakis ve ark., 1999; Tytgat ve ark., 2000). Ekim nöbeti, uzun süreli yürütüldüğünde başarı sağlamakta, yoğun sebze üretimi yapılan alanlarda ise başarılı olamamakta veya tercih edilmemektedir. Bunun da başlıca nedeni Kök-ur nematodlarının konukçu dizilerinin oldukça geniş olmasından kaynaklanmaktadır. Toprak solarizasyonu yaz aylarında uygulanmakta ve genellikle sonbahar ekimlerinde başarıyla uygulanmaktadır. Yılda iki ürün yetiştirilen seralarda veya ilkbahar ekim sisteminde ise uygulanamamaktadır. Diğer mücadele yöntemlerinin uygulanmadığı durumlarda ise kimyasal mücadele uygulamaları en sık başvuru yöntemlerdendir (Boerma ve Hussey, 1992). Bu yöntemde daha çok geniş etkili fümigantlar veya nematisitler kullanılmaktadır. Nematodlara karşı kullanılan fümigantlar ve nematisitler doğru kullanılmadığında insan ve çevre sağlığı açısından çok büyük riskler oluştururlar.

Kök-ur nematodlarına karşı uygulanan mücadele yöntemlerinin en önemlilerinden birini de dayanıklı çeşitlerin kullanımı oluşturmaktadır (Boerma ve Hussey, 1992; Vrain, 1999). Dayanıklılık çalışmaları, nematodun gelişmesini tamamen engellemesi veya çok az düzeyde tutması, özel uygulama tekniği ve alet ekipman gerektirmemesi, diğer mücadele yöntemlerine göre maliyetinin daha düşük olması ve çevre dostu olmasından dolayı tercih edilmektedir (Cook ve Evans, 1987; Boerma ve Hussey, 1992). Kök ur nematodlarına karşı; domates (Yaghoobi ve ark., 1995; Milligan ve ark., 1998), tütün (Yi ve ark., 1998), soya (Tamulonis ve ark., 1997a, 1997b), tatlı patates (Ukoskit ve ark., 1997), patates (Brown ve ark., 1996), yerfıstığı (Burow ve ark., 1996; Garcia ve ark., 1996) ve şeftali (Lu ve ark., 1998) gibi farklı bitki türlerinde dayanıklılık ıslahı çalışmaları yapılmış ve dayanıklı çeşitler üreticilerin hizmetine sunulmuştur.

Hastalık ve zararlılara dayanıklı gen kaynakları doğada çoğunlukla bitkilerin yabani formlarında bulunmakta olup melezleme çalışmaları ile kültür formlarına aktarılmaktadır (Boerma ve Hussey, 1992). Kimi durumlarda dayanıklı gen ya da genleri taşıyan yabani türler ile kültür formları arasındaki melezlemeler başarılı olamamakta ve istenilen özellik aktarılamamaktadır. Bu durum ıslah çalışmalarına sınırlama getirmektedir. Bu sınırlamalar, doku kültürü ve moleküler yöntemler kullanılarak giderilmeye çalışılmaktadır. Burada dayanıklı gen, değişik yöntemlerle

(mapped, cDNA library, chromosom walking, transposon tagging) izolasyonu yapıldıktan sonra klonlanmakta ve gen aktarım yöntemleri (*Agrobacterium tumefaciens*, biyolistik, elektroporasyon, mikroenjeksiyon vb.) kullanılarak bitkiye aktarılmaktadır (Boerma ve Hussey, 1992; Vrain, 1999).

Dünyada farklı bölgelerde yapılan araştırmalarda, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* ve *M. hapla*'nın hıyar yetiştiriciliği yapılan bölgelerde problemler oluşturduğu ve ciddi kayıplara neden olduğu bildirilmektedir (Netscher ve Sikora 1990; Wehner ve ark., 1991). Hıyar üretiminin yoğun yapıldığı Kuzey Karolayna (ABD)'da yıllık % 12'lik kayıplara neden olduğu belirtilmiştir (Wehner ve ark, 1991). Kuzey Karolayna'da ana zararlı durumunda olan *M. javanica* ve *M. arenaria*'nın neden olduğu kayıpları asgari düzeye indirmek için bu türlere karşı dayanıklı çeşit ya da çeşitleri geliştirme çalışmaları başlatılmıştır (Walters ve ark, 1993; Walters ve ark., 1996; Walters ve Wehner, 1997; Walters ve ark., 1997; Walters ve Wehner, 1998). Yabani hıyar (*Cucumis metuliferus* Naud)'ın Kök-ur nematodlarına (*M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* ve *M. hapla*) karşı dayanıklılık gösterdiği bildirilmiştir (Wehner ve ark., 1991). Bununla birlikte daha önce bu yabani tür (*C. metuliferus*) ile kültür hıyarı (*C. sativus*) arasındaki melezleme çalışmaları kromozom sayısındaki farklılıktan dolayı başarısız olduğundan (Fassuliotis, 1979) dayanıklılığı sağlayan gen ya da genlerin kültür çeşitlerine aktarılması klasik melezleme yoluyla gerçekleştirilememiştir. Kültür çeşitleri üzerine yapılan çalışmalarda *C. sativus* var. *hardwickii*'nin R Alef LJ 90430 varietesi Kök-ur nematodlarının bazı tür ve ırklarına (*M. arenaria* ırk 1, *M. arenaria* ırk 2 ve *M. javanica*) karşı dayanıklı olduğu (Walters ve Wehner, 1997) ve bu dayanıklılığın resesif tek gen (*mj*) tarafından kontrol edildiği belirlenmiştir (Walters ve ark, 1997). Bu dayanıklılık kaynağının (LJ 90430) değişik özelliklere sahip hıyar materyalleri (kültüvar, ıslah hattı ve koleksiyon materyali) ile melezlenmesi sonucu *M. arenaria* ırk 1, *M. arenaria* ırk 2 ve *M. javanica* türlerine dayanıklı Manteo (NC-44), Shelby (NC-45) ve Lucia (NC-46) olarak adlandırılan üç tane rekombinant inbred (RI) hıyar hattı geliştirilmiştir (Walters ve Wehner, 1997).

Genetik dayanıklılık, Kök-ur nematodlarına karşı mücadelede kullanılan çevre açısından risk taşımayan güvenilir bir yöntemdir. Kök-ur nematodlarına karşı

yapılan dayanıklılık çalışmalarının en önemli kısmını melezleme veya kendilere sonucu elde edilen bireylerin Kök-ur nematodlarıyla testlenmesi ve sonuçların değerlendirilmesi oluşturmaktadır. Bitkilerin, Kök-ur nematodlarıyla klasik olarak test edilmesi uzun zaman almakta, fazla iş gücü gerekmekte ve inokulasyon sırasında sorunlarla karşılaşmaktadır. Bu problemler dayanıklılık çalışmalarının yavaş ilerlemesine neden olmaktadır. Bütün bu olumsuzluklar, Kök-ur nematodlarına karşı dayanıklılık sağlayan gene bağlı moleküler markır veya markırların geliştirilmesiyle aşılabilmektedir. Moleküler markırlar kullanarak bitkilerin çok erken döneminde (fide dönemi) dayanıklılık geni taşıyıp/taşımadıkları hızlı ve güvenli şekilde test edilmektedir. Moleküler markırlar, aynı anda çok bitkinin analizine imkân tanımakta ve aynı bitkide birden fazla dayanıklılık geni analiz edilebilmektedir. Ayrıca kullanılacak markırın codominant olması, heterozigot ve homozigot dayanıklı bireyleri birbirlerinden ayırabildiği için ıslah çalışmasına büyük bir hız vermektedir. Bununla birlikte dayanıklılık genine bağlı moleküler markırların belirlenmesi, dayanıklılık geninin klonlanması için önemli bir adım oluşturmaktadır.

Kök-ur nematodları hıyarda ekonomik düzeyde kayıplara neden olmakla birlikte, günümüzde ticari olarak kullanılan nematoda dayanıklı hıyar çeşitleri ve dayanıklılığı kontrol eden gene bağlı moleküler markır bulunmamaktadır. Moleküler markırların geliştirilmesi amacıyla,

Bu çalışmada;

C. sativus var. *hardwickii* LJ 90430 varyetesi kaynağından geliştirilen nematodlara dayanıklı homozigot “Lucia”, “Manteo” ve “Shelby” hatlarıyla homozigot duyarlı “Batem1” ve “Batem2” hatlarını ayrı ayrı melezlenip F₁ bitkileri, F₁ bitkileri de kendilenerek F₂ bitkileri elde edilmiştir.

Ebeveynler, F₁ ve F₂ bireyleri, *M. javanica* ırk 1 ile testlenerek bitkilerin nematoda olan tepkileri ve dayanıklılığın resesif tek gen tarafından kontrol edildiği belirlenmiştir.

Moleküler markırlar (RAPD, SCAR, AFLP ve SSR), kullanılarak dayanıklı ve duyarlı ebeveynler arasında polimorfizm belirlenmeye çalışılmış ve bulunan polimorfizm F₂ bireylerinde incelenmiştir.

AFLP markırları ile gene (*mj*) bağılı olduğu düşünölen markırlar belirlendikten sonra klonlanmış ve sekansı yapıldıktan sonra spesifik PCR primerlerine dönüştürölerek ebeveynler arasında etkin çalışıp/çalışmadığı araştırılmıştır.

SRAP primerleri, hıyar genomuna özgü primerlerle birlikte PCR yapılarak ebeveynler arasındaki polimorfizmler belirlenmiştir. Bu polimorfizmler, F₂ bireylerinde incelenmiş ve MapMaker Exp 3.0 programı ile analiz edilerek *mj* genine olan uzaklıkları belirlenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Kök-Ur Nematodlarıyla İlgili Çalışmalar

2.1.1. Kök-Ur Nematodlarının Yaygınlıkları, Konukçuları ve Zararları

Diker (1959), Samsun ve Trabzon'un kök ur nematodlarıyla bulaşık olduğunu ve *M. hapla*'nın Karadeniz Bölgesinde bulunduğunu bildirmiştir.

Alkan (1962), Türkiye'de *M. hapla*, *M. arenaria*, *M. incognita* ve *M. javanica* türlerinin bulunduğunu belirtmiştir.

Bora (1970), Karadeniz bölgesinde sebzelerde ve tütünlerde *M. incognita*'nın ve *M. incognita* var. *acrita*'nın bulunduğunu bildirmiştir. 1961–1968 yılları arasında bölgede yaptığı çalışmalarda sahil boyunca kumsal topraklarda, Amasya'nın Yeşilirmak'la sulanan sebze alanlarında, Turhal, Niksar ve Trabzon'un tütün ekili alanlarında farklı yoğunluklarda Kök-ur nematodları ile bulaşık olduğunu tespit etmiştir.

Öztüzün (1970), Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde kültür bitkilerinde zararlı olan nematodlarla ilgili yaptığı sürvey çalışmalarında Malatya ve Elazığ illerindeki sebze ekim alanlarında, yalnızca *M. incognita* türünün bulunduğunu bildirmiştir.

Ertürk ve Özkut (1973), Ege bölgesinde bağ alanlarında (Menemen, Alaşehir, Salihli, Sarıgöl, Saruhanlı, Turgutlu) yürüttükleri çalışmada *M. incognita*, *M. thamesi* ve *M. javanica* Kök-ur nematod türlerinin bulunduğunu bildirmişlerdir.

Yüksel (1974), Türkiye'de Kök-ur nematodlarının yaygınlıkları üzerine yaptığı çalışmada; Karadeniz Bölgesi'nde *M. incognita* ve *M. arenaria*; Marmara Bölgesi'nde *M. incognita*, *M. incognita* var. *acrita*, *M. javanica*, *M. arenaria* ve *M. hapla*; Ege Bölgesi'nde *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* ve *M. hapla*; Akdeniz Bölgesi'nde *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* ve *M. hapla*'nın bulunduğunu tespit etmiştir.

Ertürk ve ark. (1975), Ege Bölgesi'nde pamuk alanlarında yaptıkları çalışmalarda en yaygın nematod türlerinin *Meloidogyne* spp. (*M. incognita*, *M.*

incognita var. *acrita*, *M. javanica*) (%58), *Tylenchorynchus* spp (%28), *Helicotylenchus* spp. (%14) ve diğerlerinin takip ettiğini bildirmişlerdir.

Gürdemir ve Ağdacı (1975), Antalya ve Mersin illerinde yaptıkları çalışmada Antalya seralarının %75,79'unun, Mersin seralarının ise %23,09'unun kök ur nematodları ile bulaşık olduğunu ve en yaygın türlerin *M. incognita* (%71,1), *M. javanica* (%14,90), *M. arenaria* (%6,01) ve *M. thamesi* (%2,40) olduğunu bildirmişlerdir.

Hekimoğlu (1975), İzmir ve çevresinde *Solanaceae* familyasına ait önemli bitki türlerinde yaptığı çalışmada *M. incognita* (% 44,3), *M. javanica* (%34,1) ve *M. arenaria* (% 6,4)'nın en yaygın türler olduğunu saptamışlardır.

Ağdacı (1978), 1973–1976 yılları arasında Akdeniz Bölgesi'nde kabakgil yetiştiriciliği yapılan 717 adet serada yürüttüğü çalışmada, 248 seranın kök-ur nematod türlerinden *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* ve *M. thamesi* ile bulaşık olduğunu belirlemiştir. Kök-ur nematodlarının, Antalya'da % 16.70 Adana'da ise % 47 oranında zararlara neden olduğunu ve bulaşık bitkilerin vejetatif gelişmelerinin sağlıklı bitkilere göre önemli ölçüde zayıf kaldığını tespit etmiştir.

Sasser (1979), tropik iklim bölgelerinde yürütülen araştırmalarda, *Meloidogyne* spp., nedeniyle tüm ürünler ele alındığında ortalama olarak Güney Amerika'da %15, Batı Afrika'da %25, Güneydoğu Asya'da %11 oranında ürün kayıplarının olduğunu belirtmiştir. Tropik bölgelerde yetiştirilen önemli ürünlerden domateste %29, patlıcanda %23, bamyada %22 ve biberlerde %15'lik bir ürün kaybı olduğunu bildirmiştir.

Eisenback ve ark. (1980), Triantaphyllou (1966)'ya atfen *M. hapla*'nın A ve B olmak üzere iki sitolojik ırkının bulunduğunu belirtmişlerdir.

Enneli (1980), İç Anadolu Bölgesi'nde Kök-ur nematodlarıyla bulaşıklık oranının %10–94 olduğunu ve en yaygın türlerin *M. incognita* (%93), *M. javanica* (%2) ve *M. arenaria* (%1) olduğunu bildirmiştir.

Sasser ve ark. (1983), *M. incognita*'nın tütün (NC95) ve pamuk (Deltapine 16 veya 61) bitkilerindeki reaksiyonlarına göre konukçu ırklarının belirlendiğini, çalışılan *M. incognita* populasyonlarından %72'sini ırk 1, %13'ünü ırk 2, %13'ünü ırk 3 ve %2'sini ise ırk 4'ün oluşturduğunu belirlemişlerdir.

Johnson ve Fassuliotis (1984), dünya genelinde 75 ülkeden elde edilen 1000 adet Kök-ur nematodu popülasyonundan %52'sinin *M. incognita*, %30'unun *M. javanica*, %8'inin *M. arenaria*, %8'inin *M. hapla* ve %2'sinin ise diğer türlerden oluştuğunu bildirmişlerdir.

Sasser ve Carter (1985), 70 ülkeden topladıkları 850 Kök-ur nematod popülasyonu üzerinde yürüttükleri çalışmada, bu popülasyonların %97'sinde, Dünya da en yaygın dört Kök-ur nematod türünün (*M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* ve *M. hapla*) olduğunu tespit etmişlerdir.

Netscher ve Sikora (1990), Kök-ur nematodlarının domateslerde %42–54, patlıcanlarda %30–60 ve kavunlarda %18–33 oranlarında ürün kaybına sebep olduklarını belirtmişlerdir.

Decker ve Fritzsche (1991), dünyada *M. incognita*'nın 4, *M. javanica*'nın 2 ve *M. arenaria*'nın 2 ırkının olduğunu, *M. hapla*'nın konukçu ırklarının henüz tespit edilmediğini bildirmişlerdir.

Pehlivan ve Kaşkavalı (1993), 1992–1993 yıllarında Batı Anadolu Bölgesi sanayi domates üretim alanlarında yaptıkları çalışmada, bu alanların %63,9'unun Kök-ur nematodları ile bulaşık olduğunu ve *M. incognita* (%72,97) ve *M. javanica* (%27,03) türlerinin bulunduğunu belirtmişlerdir.

Elekçioğlu ve Uygun (1994), Doğu Akdeniz Bölgesi'nde ekonomik öneme sahip kültür bitkilerinde bitki paraziti nematodların tespiti ve dağılımı üzerine yaptıkları çalışmada, muz ve birçok sebzenin köklerinde *M. incognita*, *M. javanica* ve *M. arenaria*'nın bulunduğunu, *M. incognita* ve *M. javanica*'nın özellikle sebzelerde (domates, biber, patlıcan vb.) yoğun popülasyonlar oluşturduklarını tespit etmişlerdir.

Söğüt ve Elekçioğlu (2000), Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yürüttükleri çalışmada *M. javanica*'ya ait ırk 1, *M. incognita*'ya ait ırk 2 ile ırk 4 olmak üzere toplam 3 Kök-ur nematodu ırkı tespit etmişlerdir. *M. javanica*'ya ait 4, *M. incognita*'ya ait 1 ve *M. hapla*'ya ait 1 popülasyonun ise konukçu testine göre uygun reaksiyon göstermediği için ırk düzeyinde teşhisinin yapılamadığını bildirmişlerdir.

Mennan ve Ecevit (2001), Bafra ve Çarşamba ovalarında *M. incognita*'nın hâkim tür olduğunu ve bu türden yalnızca ırk 2'nin bulunduğunu bildirmişlerdir.

2.1.2. Hıyarda Kök-Ur Nematodlarına Karşı Dayanıklılık Çalışmaları

Wehner ve ark. (1991), *C. sativus* ve *C. metuliferus*'un dört Kök-ur nematod türüne (*M. arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* ve *M. javanica*) karşı dayanıklılığını ve inokulasyon periyodunun dayanıklılıkta önemini ortaya koymak için 6 ve 12 haftalık zaman dilimlerini kullanmışlardır. *C. metuliferus*'un nematod türlerine karşı dayanıklılık düzeylerinin değişiklik gösterdiğini, *C. sativus* Sumter çeşidinin *M. arenaria*, *M. incognita* ve *M. javanica*'ya karşı çok hassas olduğunu ve *C. sativus* ve *C. metuliferus*'un bütün hat veya çeşitlerinin *M. hapla*'ya karşı dayanıklı olduğunu bildirmişlerdir. Dayanıklılık düzeyini belirlemede 12 haftalık sürenin 6 haftalık süreye göre daha kesin sonuçlar verdiğini belirtmişlerdir.

Walters ve ark. (1992), *C. sativus* ve *C. metuliferus* köklerinde *Meloidogyne* spp. (*M. arenaria* ırk 2, *M. incognita* ırk 1, *M. incognita* ırk 3 ve *M. javanica*) zararı sonucu oluşan kök çürümelerinin ur indeksi ve yumurta kümesi sayıları arasında bir ilişki olup/olmadığını araştırmışlardır. Kök dokularının tahrip olması sonucunda urlanma hala görünse bile Kök-ur nematodun üremesinin olmadığını, hıyarda ur indeksi ve yumurta kümesi sayıları arasındaki ilişkinin kökün ölmeye başlamasıyla zıt bir etkiye sahip olduğunu açıklamışlardır.

Walters ve ark. (1993), Amerika'daki *C. sativus* ve *C. metuliferus* gen kaynaklarının Kök-ur nematodlarına (*M. arenaria* ırk 2, *M. incognita* ırk 3, *M. hapla*) karşı dayanıklılığını test etmişlerdir. *C. metuliferus*'un (24 adet) test edilen bütün nematodlara, *C. sativus*' un (884 adet) tümünün *M. hapla*'ya, birkaç tanesinde *M. incognita* ırk 3'e, *C. sativus*'un (50 adet) zayıf düzeyde *M. arenaria* ırk 2'ye ve *M. incognita* ırk 3'e dayanıklı olduğunu belirlemişlerdir. *C. sativus* var. *hardwickii* ve Mincu'nun *M. arenaria* ırk 2'ye orta düzeyde dayanıklı olduğunu *C. sativus* var. *hardwickii*'nin *M. javanica*'ya dayanıklı tek kültür hıyar varyetesi olduğunu, bütün *C. sativus* varyetelerinin *M. incognita* ırk 1 ve 3'e karşı duyarlı olduğunu belirtmişlerdir.

Walters ve ark. (1996), *C. sativus* var. *hardwickii* (NC 42, NC 43, PI 215589), Mincu, Sumter, Wis. SMR 18 hatlarının *M. arenaria* ırk 1, *M. arenaria* ırk 2 ve *M. javanica* nematodlarına dayanıklılığı üzerine yaptıkları çalışmada; NC 42'nin

M. arenaria ırk 1, *M. arenaria* ırk 2 ve *M. javanica*'ya; NC 43'ün *M. arenaria* ırk 2'ye; Mincü ve PI 215589'un *M. arenaria* ırk 2'ye dayanıklı, buna karşın Sumter ve Wis. SMR 18'nun testlenen bu nematodlara karşı duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

Walters ve Wehner (1997), *C. sativus* var. *hardwickii* LJ 90430 ile farklı özelliklere sahip hıyar hatlarının melezlenmeleri sonucu geliştirdikleri saf hatların Lucia, Monteo ve Shelby'nin *M. arenaria* ırk 1, *M. arenaria* ırk 2 ve *M. javanica*'ya dayanıklı olduğunu bildirmişlerdir.

Walters ve ark. (1997), *M. javanica*'ya dayanıklı *C. sativus* var. *hardwickii* LJ 90430 ile bu nematoda duyarlı hıyar hatlarının (Sumter, Addis, Gy 14, Gy 57u ve Poinsett) melezlemeleri sonucu elde edilen F₁, F₂ ve BC₁ (geri melezleme) bireyleri üzerine yaptıkları testleme çalışmalarında, *M. javanica*'ya dayanıklılığın resesif tek gen tarafından sağlandığını belirlemişler ve bu geni *mj* geni olarak isimlendirmişlerdir.

Walters ve Wehner (1998), hıyarda *M. javanica*'ya dayanıklı *mj* geninin diğer genlerle bağıllık durumu üzerine yaptıkları çalışmada, bu genin 17 genden (B:siyah diken, B-3: siyah diken 3, B-4: siyah diken 4, Bt: Acı meyve, D: Donuk meyve yüzeyi, df: Gecikmiş çiçeklenme, de: Oturak yapı, F: Dişi cinsiyet ifadesi, lh: Uzun hipokotil, ns: Çeşitli dikenler, pm-h: Hipokotillerde mildiyöye dayanıklılık, R: kırmızı olgunlaşmış meyve, ss: Küçük dikenler, te: Zayıf meyve yüzeyi, Tu: Yumrulu meyve, u: Yeknesak olgunlaşmamış meyve rengi, w: Beyaz olgunlaşmamış meyve rengi) bağımsız olduğunu ve II. kromozom üzerinde veya III. kromozomun ucunda olabileceğini bildirmişlerdir.

Walters ve ark. (1999), 10 farklı hıyar hattını (Souther Pickler, Mincü, LJ 90430, Poinsett, Producer, Coolgreen, Straight 8, WI 2757, Wis. SMR-18 ve Sumter) hem serada hem de açık tarlada *M. arenaria* ırk 1, *M. arenaria* ırk 2 ve *M. javanica*'ya karşı iki yıl test etmişlerdir. Sera ve tarla koşullarında dayanıklılık durumunda farklılık olmadığını, pozitif korelasyon gösterdiklerini ve çevrenin dayanıklılıkta etkili olmadığını saptamışlardır.

2.2. Moleküler Markır Sistemleriyle İlgili Çalışmalar

2.2.1. Genetik Çeşitlilikte Moleküler Markırların Kullanılması

Maughan ve ark. (1996), 23 tane kültüvar soya (*Glycine max* L. Merr) ve yabani soya (*Glycine soja* Siebold & Zucc.) arasındaki genetik ilişkiyi 15 AFLP primeri ile çalışmışlar ve 750 AFLP fragmenti belirlemişlerdir. *G. max*'da % 17 (127 bant) ve *G. soja*'da % 31 (237 bant) polimorfizm oranı bulmuşlardır.

Folkerstma ve ark. (1996), patates kist nematodlarının (*Globodera rostochiensis*, *G. pallida*) tür içi ve türler arası benzerliklerini AFLP markerleri ile incelemişlerdir. *G. rostochiensis* populasyonlarında %15 bandın polimorfik olduğunu ve genetik benzerliğin %81–93 olduğunu, *G. palli*'da populasyonlarında ise %23 bandın polimorfik ve benzerlik oranının ise %52–97 olduğunu belirlemişlerdir. İki tür arasında ise % 64'lük benzerliğin olduğunu bildirmişlerdir.

Lin ve ark (1996), soyanın genetik haritasını yapmada RFLP, RAPD ve AFLP markerlerini kullanmışlardır. Bu markerlerden AFLP'nin polimorfizm bulmada diğerlerinden çok üstün olduğunu, ortalama her primer kombinasyonunda 12 polimorfik bant elde edilebileceğini belirtmişlerdir.

Hongtrakul ve ark. (1997), 24 tane saf ayçiçeği (*Helianthus annus* L.) hatları arasındaki genetik benzerliği ve polimorfizm oranını belirlemek için AFLP marker sistemini kullanmışlardır. 6 AFLP primer kombinasyonu ile toplam 359 marker bulmuşlardır. Hatlar arasındaki genetik benzerlik oranını %70–90, polimorfizm oranını ise %7–24 olarak bildirmişlerdir.

Hartl ve Seefelder (1998), sekiz şerbetçi otu (*Humulus lupulus* L.) kültüvarı arasındaki ilişkiyi AFLP markır sistemi kullanarak belirlemişlerdir. Kullanılan her primer kombinasyonunda 18 polimorfik bant bulmuşlar ve Saazer, Tettnanger ve Spalter kültüvar çeşitlerini birbirlerinden ayıramamışlardır. En düşük genetik benzerliğin acı kültüvarlardan olan Hallertauer Magnum ile Wye Target arasında (%89) olduğunu belirtmişlerdir.

Semblat ve ark. (1998), *M. arenaria*, *M. incognita* ve *M. javanica*'nın farklı populasyonlarının tür içi genetik varyasyonunu AFLP marker sistemi ile

belirlemişlerdir. Genetik varyasyon değerinin *M. arenaria*'da %9,7, *M. incognita*'da %4,4 ve *M. javanica*'da %3,3 olarak bulunduğunu bildirmişlerdir.

Tzortzakakis ve ark. (1999), AFLP markırı ile 22 adet *M. javanica* popülasyonu arasındaki genetik ilişkiyi araştırmışlar ve bu popülasyonlar arasında çok yüksek (% 99,4) bir genetik benzerlik bulmuşlardır.

Ferriol ve ark. (2003), AFLP ve SRAP markır sistemlerini iki alt türden oluşan toplam 69 tane kabak (*Cucurbita pepo* L.) genetik materyallerinin analizinde kullanmışlardır. UPGMA analizine göre her iki marker ile iki alt türün net şekilde birbirlerinden ayrıldığını, SRAP markeri ile elde edilen bilginin morfoliplerin tarihsel gelişimi ve morfolojik çeşitlilik için AFLP marker sisteminden daha uyumlu olduğunu bildirmişlerdir.

2.2.2. Dayanıklılık Çalışmalarında Moleküler Markırlarının Kullanılması

Ballvora ve ark. (1995), patatesin VII. kromozomu üzerinde bulunan patates kist nematoduna (*Gobodera. rostochiensis*) karşı dayanıklılığı sağlayan *Gro1* bölgesini RFLP, RAPD ve AFLP markırları kullanarak haritalamışlardır. *Gro1* bölgesine; 0,6 cM ve 0,8 cM uzaklıkta iki AFLP markırı tanımlamışlar, bu markırları PCR primerlerine dönüştürerek *Gro1* geni taşıyan dayanıklı bitkilerin duyarlı bitkilerden kolaylıkla ayrılabilirdiğini saptamışlardır.

Jong ve ark. (1997), patateste patates X virüsü'ne karşı dayanıklılığı sağlayan Nb genine bağlı markırı tanımlamak için AFLP-BSA tekniğini kullanmışlardır. 96 AFLP primer ile toplam 9600 DNA bandı elde etmişler ve DNA bantlarının uzunluğunun 40–400 bp arasında olduğunu belirlemişlerdir. Sekiz markırın Nb genine bağlı olduğunu tespit etmişler ve bu markırlardan SPUD237 ve GP21'i, CAPS markırına dönüştürmüşlerdir. Nb geninin, patatesin 5. kromozomunda olduğunu ve diğer dayanıklı genlerle birlikte (R1, *Phytophythora infestans*; Gpa ve rx2: *Globodera pallida*) bulunduğunu tanımlamışlardır.

Roupe van der Voort (1997), patates kist nematoduna (*G. pallida*) karşı dayanıklılığı kontrol eden 12. kromozom üzerinde bulunan Gpa2 bölgesini AFLP markırları kullanarak haritalamışlardır. Gpa2 bölgesi, *G. pallida*'nın farklı

populasyonlarına karşı dayanıklılık sağlamaktadır. Başka bir çalışmada belirlenen diğer dayanıklı lokus H1 ile bağlantılı olmadığını fakat patates X virüsüne karşı dayanıklılığı kontrol eden Rx1 bölgesiyle bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir.

Lu ve ark. (1998), şeftalide (*Prunus persica* L.) Kök-ur nematodlarına dayanıklılığı sağlayan Mi ve Mij genlerine bağlı codominat AFLP markırı belirlemişlerdir. Mi genine bağlı EAT/MCAT2 AFLP markırın, 3,4 cM ve Mij genine bağlı EAA/MCAT10 markırın ise 6,0 cM uzaklıkta olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu markırların şeftali anaç ıslahında MAS için uygun olabileceğini belirtmişlerdir.

Lu ve ark. (1999), şeftali anaçlarında *M. incognita* ile *M. javanica*'ya dayanıklı gene bağlı markır oluşturmak için AFLP markır sistemini kullanmışlardır. Gene bağlı AFLP markırını belirledikten sonra bu markırı klonlayıp DNA dizilimini ortaya koymuşlardır. Dizilim analizlerinden yola çıkarak değişik primerler dizayn etmişler ve bunları melezleme sonucu oluşturdukları farklı F₁ ve F₂ bireylerinde kullanmışlardır. Mij3F ile Mij1R olarak adlandırdıkları primerlerin MAS'da uygun şekilde kullanılabileceğini ve PCR ürünlerinin Sau3 enzimi ile kesilmesi sonucu co-dominant markır elde edildiğini bildirmişlerdir.

Li ve Quiros (2001), temel olarak ORFs (Open Reading Frames) bölgesinin çoğaltılmasına dayanan SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism) olarak isimlendirdikleri yeni bir markır sistemi geliştirmişlerdir. Bu tekniği *Brassica oleracea*'ya ait rekombinant hatlar ile di-haploid hatlar üzerinde çalışmışlardır. Jelden izole edilen bantların %45'i dizilim analizinden sonra Gen bankasında bulunan bilinen genler ile eşleşmiş olduğunu bildirmişlerdir. Dizilim analizinden sonra SRAP markırlerinin %20'sinin co-dominant olduğunu ve SRAP ile *Brassica*'da bulunan glucosinolate desaturation genini (BoGLS-ALK) işaretlediklerini belirtmişlerdir.

Xu ve Korban (2000), elmada fungal patojen olan *Venturia inaequalis* (Cke.)'e dayanıklılığı sağlayan Vf genine karşı AFLP-BSA kullanarak genin interval durumunda 0,6 cM uzaklıkta 15 AFLP markeri belirlemişlerdir. Bunlardan 7 tanesinin Vf geninden ayrı olmadığını, 1 tanesinin genin solunda geri kalan 7 tanesinin ise genin sağında olduğunu bildirmişlerdir.

Von Malek ve ark. (2000), güllerde fungal patojen *Diplocarpon rosae* Wolf karşı dayanıklılığı sağlayan Rdr1 genine bağlı moleküler markır belirlemek için 868 RAPD ve 114 AFLP primer konbinasyonu kullanmışlardır. 7 AFLP markırının Rdr1 genine 1,1 ve 7,6 cM uzaklıkta olduğunu belirlemişlerdir. Gene en yakın AFLP markırını klonlamışlar ve SCAR'a dönüştürmüşlerdir. Geniş popülasyonda yaptıkları çalışmada elde edilen bu SCAR markırını gene 0.76 cM uzaklıkta olduğunu ve bu fungal patojene karşı dayanıklılık ıslahı çalışmalarında kullanılabileceğini açıklamışlardır.

Ni ve ark. (2001), çeltik bitkisinde *Sclerotium oryzae*'ye karşı dayanıklılık sağlayan genle ilgili markır oluşturmak için, dayanıklı ve duyarlı bitkileri melezlemeleri sonucu elde ettikleri F₂ bireylerinin oluşturdukları dayanıklı ve duyarlı havuzlarda 900 AFLP primer kombinasyonu kullanmışlardır. 1 tane AFLP markeri 59 bireyde %45 fenotipik varyasyonda hesaplanmış ve bu hastalığın önemli düzeyde birlikte olduğunu göstermiştir. Bu markırın, çeltikte 2. kromozomda bulunan RFLP markerleri (R7166-RG139) arasında bulunduğunu bildirmişlerdir.

Ouedraogo ve ark. (2001), börülcede (*Vigna unguiculata*) ekonomik kayıplara neden olan *Striga gesnerioides*'e karşı dayanıklılığa bağlı moleküler markır tanımlamak için AFLP ve BSA analizini kullanmışlardır. *S. gesnerioides* ırk 1'e karşı dayanıklılığın dominant tek gen tarafından (Rsg2-1) kontrol edildiğini bildirmişlerdir. Bu gene; 0,9 cM, 2,6 cM ve 0,9 cM uzaklıkta 3 AFLP markırı belirlemişlerdir. Ayrıca *S. gesnerioides* ırk 3'e karşı da dayanıklılığın dominant tek gen (Rsg4-3) tarafından kontrol edildiğini ve bunu 10,1 cM, 4,1 cM, 2,7 cM, 3,6 cM, 5,1 cM ve 3,6 cM uzaklıkta 6 adet AFLP markırı belirlediğini bildirmişlerdir.

Agrama ve ark. (2002), mısırdaki *Peronosclerospora sorghi*'ye karşı dayanıklılığı sağlayan genle ilgili markır belirlemek için AFLP ve BSA analizini kullanmışlardır. 64 AFLP primer kombinasyonu ile yaptıkları araştırmada 3 primer kombinasyonunun 1. ve 9. kromozom üzerinde bulunduğunu, 1 primer kombinasyonunun ise duyarlı bireylere bağlı olduğunu fakat herhangi bir kromozom ile ilişkili olmadığını belirlemişlerdir. SCAR'a dönüştürülen bu dizilerin GenBank analizinde herhangi bir dayanıklılık geniyle ilişkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

Dussle ve ark. (2002), mısırdaki şeker kamışı mozaik virüsüne (SCMV) karşı dayanıklılığı kontrol eden Scmv1 (kromozom 6'da) ve Scmv2 (kromozom 3) genlerine bağlı 6 AFLP markırı belirlemiştir. Bu dominant markırı MAS'da kullanmak için markırların dizilim analizlerini yapmışlardır. Bunlardan 1. dominant AFLP markırının (E35 M62-1) indel markırı (insort/silinme; insetion/deletion), 2. AFLP markırının (E33/M61-2) ise CAPS markırı olduğunu belirlemiştir. Her iki markırla yaptıkları çalışmada E33/M61-2'nin kromozom 3'de, E35/M62-1'in ise kromozom 6'da sınırlandırılmış (lokalize) olduğunu ortaya koymuşlar ve bunların markır yardımcı seleksiyon ve SCMV'ye dayanıklı genin haritalanmasında kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Sardesai ve ark. (2002), çeltiğin en önemli zararlısı olan *Orseolia oryzae*'nin 1, 2 ve 4 biotiplerine karşı dayanıklılığı kontrol eden dominant Gm7 genine bağlı moleküler markırı belirlemek için 157 AFLP primer kombinasyonu kullanmışlardır. Bu primer kombinasyonlarından 4 adedinin (EcoRI/MseI) duyarlı bireylere, 20 adet (PstI/MseI) duyarlı bireylere, 5 adet (PstI/MseI) ise duyarlı bireylere bağlı olduğu belirlemiştir. Bunlardan P-CGxM-CTG primer kombinasyonu ile elde edilen DNA bandının 24 duyarlı bireyin, 22 tanesinde bulunduğunu tespit etmişlerdir. Gm7 genine bağlı olduğunu düşündükleri bu bandı klonladıktan sonra, sekans etmişler ve seçici primerler dizayn ederek SCAR'a dönüştürmüşlerdir. Bu markırın çeltik ıslahında bu zararlıya karşı dayanıklılık çalışmalarında kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Williams ve ark. (2002), buğday ve diğer bitkilerin ekonomik zararlılarından biri olan Kök lezyon nematodu, *Pratylenchus neglectus*'a karşı moleküler markır oluşturmak amacıyla yaptıkları çalışmada di-haploid populasyonları dayanıklılık yönünden tanımlamışlardır. BSA-AFLP yöntemi kullanarak Excalibur kültür buğdayında *P. neglectus*'a bağlı AFLP markırı tanımlamışlardır. 1 AFLP markırın Cranbrook/Halberd populasyonundaki RFLP markırına yakın olduğunu bildirmişlerdir. 7A RFLP propları (cdo347) Tammin/Excalibur populasyonunda *P. neglectus*'a dayanıklılık genine (Rlnn1) %8 rekombinasyon uzaklıkta olduğunu bildirmişlerdir.

Cai ve ark. (2003), mısırdaki *Helminthosporium maydis*'e karşı dayanıklılığı kontrol eden *rh*m genine bağlı moleküler markırı belirlemek için AFLP-BSA yöntemlerini kullanmışlardır. Dayanıklı ve duyarlı havuzları 215 primer kombinasyonu ile taramışlar ve 222 polimorfik DNA bantları belirlemişlerdir. 80 F₂ bireyinde iki havuz arasında yaptıkları çalışmada bu markırlardan 16 adedinin *rh*m'e bağlı olmadığı, 103 adedinin 5,9–21,9 cM, 84 adedinin 5,2 cM ve 19 adedinin ise 5 cM uzaklıkta *rh*m'e bağlı olduğunu tespit etmişlerdir. Bunlar arasında p7m36 (PstI+ATG/ MseI4TAC) 720 F₂ bireylerinde yapılan analiz sonucunda 1,0 cM uzaklıkta olduğunu bildirmişlerdir.

Evans ve James (2003), elmada mildiyöye (*Podosphaera leucotricha*) karşı dayanıklılığı sağlayan P1-w genine bağlı moleküler markırı belirlemek için 176 AFLP primer kombinasyonu kullanmışlardır. Bu kombinasyonlardan 7 AFLP markırı, dayanıklı ve duyarlı havuzlar arasında farklılık göstermiş ve 114 bireyde yaptıkları taramada, bunlardan iki tanesinin (EM M01 ve EM M02) P1-w genine 4,6 ve 6,4 cM uzaklıkta olduğunu ortaya koymuşlar ve bunları SCAR'a dönüştürdüklerini belirtmişlerdir.

Tullu ve ark. (2003), mercimekte antraktoz (*Colletotrichum truncatum*) hastalığına karşı moleküler markır oluşturmak için yaptıkları çalışmada 147 adet RIL kullanmışlardır. Elde ettikleri dayanıklı ve duyarlı hatlardan oluşturulan iki ayrı havuzu, 700 RAPD primerleri ve 8 AFLP primer kombinasyonu BSA-RAPD ve BSA-AFLP yöntemleri kullanarak analiz etmişlerdir. Dayanıklılığı sağlayan major geni, LCt-2 geni olarak adlandırmışlardır. MapMaker analizine göre, LCt-2 bölgesine OPE06₁₂₅₀, repulsin (6,4 cM), UBC-704₇₀₀ ise coupling (10.50 cM) olarak bulmuşlardır. AFLP markırları; EMCTTACA₃₅₀ ve EMCTTAGG₃₇₅ coupling, EMCTAAAG₁₇₅ ise repulsion olarak LCt-2 bölgesine bağlı olduğunu belirlemişlerdir.

Weiland ve Yu (2003), şekerpancarında 6 farklı *Meloidogyne* türüne karşı dayanıklılığı sağlayan R6m-1 bölgesine özgü moleküler markır oluşturmak için RAPD markırları kullanmışlardır. Nem06 olarak adlandırdıkları 600 bp uzunluğunda bir DNA markırının yalnızca dayanıklı bireylerde olduğunu belirlemişlerdir. Bu bandın sekans edilmesi sonucu oluşan diziden yararlanarak oluşturdukları Nem06-

FWD ve Nem06REV primerleri hem dayanıklı hem de duyarlı bireylerde aynı bandı vermiştir. Elde ettikleri PCR ürünlerini sekans ederek sonucu dayanıklı ve duyarlı bireyler arasında 1 baz farklılık bulmuşlardır. Bulunan bu farklılığı MseI kesim enzimi kullanarak CAPS'a çevirmişler ve ıslah çalışmalarında rutin olarak kullanılabilecek bir markır olduğunu bildirmişlerdir

Chen ve ark. (2004), mısırdaki *Puccinia polysora* Underw'ya dayanıklılığı kontrol eden dominant tek geni RppQ haritalamak için SSR ve 54 AFLP primeri kullanmışlardır. 1 AFLP markırı (AF1) RppQ genine, 3.34 cM uzaklıkta ve RppQ geninin 10. kromozom üzerinde olduğunu belirlemişler ve SSR markırı (phi 041) ile AFLP markırıyla geni haritalamışlardır.

2.2.3. Hıyarda Moleküler Markırların Kullanılması

Kennard ve ark. (1994), hıyar çeşitlerinin melezlenmeleri sonucu elde edilen haritalama bireylerinde; RFLP, RAPD, morfolojik ve hastalığa dayanıklılık markırları kullanarak 10 bağlantı grubunda 766 cM mesafede 58 genetik harita belirlemişlerdir. Bulunan birkaç polimorfizmin daha önce yapılan çalışmalarla paralellik gösterdiğini bildirmişlerdir. İstatiksel olarak ($P<0.001$) uygun olması beklenen RAPD markırının %64'nün bağlantılı olmadığı görülmüştür. Bu sonucun F_2 bireylerinde bağlantıyı tanımlamada dominant markırların etkisizliği ve PCR çalışmasındaki zayıf çoğalmadan kaynaklanabileceği şeklinde açıklamışlardır. *C. sativus* var. *sativus* ile *C. sativus* var. *hardwickii*'nin melezlenmesi sonucu elde edilen haritalama populasyonunda RFLP, RAPD, morfolojik ve hastalığa dayanıklı markır kullanarak 10 bağlantı grubunda ise 480 cM mesafede 70 genetik harita belirlemişlerdir.

Katzir ve ark. (1996), kabakgil türlerinde (8 kavun, 11 hıyar, 5 kabak, 1 balkabağı ve 3 karpuz) SSR markırlarının kullanımı ile ilgili yaptıkları çalışmada; *C. melo* genomik kütüphanesinden izole edilen 5 tane (CT/GA)_n, *C. sativus*'un gen bankasından elde edilen 2 tane (CT)₈ ve (AT)₁₃ tekrarlı dizilerini kullanmışlardır. Bu çalışma sonucu toplam 7 SSR'ın 5 tanesi, 8 kavun genotipinde polimorfizm gösterdiği ve alleler arasında 0,53–0,75 arasında bir genetik uzaklık; 7 SSR'ın 4

tanesi de 11 hıyar genotipinde 18–0.64 arasında bir genetik uzaklık gösterdiğini bildirmişlerdir.

Serquen ve ark. (1997), 80 noktada genetik haritalama çalışmasında [77 tane RAPD, *F* (female sex expresion), *de* (determinate) ve *II* (little leaf)] determinate, gynoecious, standard-geniş yaprak özelliği taşıyan G421 hıyar hattı ile indeterminate, monoecious küçük yaprak hattı özelliğini taşıyan H–19 hattının melezlemesini gerçekleştirmişlerdir. Harita, 9 bağlantı grubunda (600 cM) tanımlanmış ve markırlar arasındaki ortalama uzaklık 8,4-9,4 cM olarak belirlenmiştir. BC–551 RAPD markırının, *II* genine 3,4 cM; BC-592 RAPD markırının 12.2 cM uzaklıkta, OP-L18–2 ise *de* genine 16 cM olarak belirlemişlerdir. Ayrıca 100 F₃ bireyini, cinsiyet özelliği, ana gövde uzunluğu, yan dal sayısı, meyve sayısı ve ağırlığı, meyve uzunluk ve çapı meyve uzunluk/çap oranı gibi QTL özelliklerini tanımlamak için kullandıklarını bildirmişlerdir.

Horejsi ve ark. (1999), hıyarda RAPD SCAR markırlarına dönüşümünü ve farklı PCR koşullarının etkisini araştırmışlardır. SCAR markır oluşturmak için 75 tane RAPD-PCR ürününü klonlamışlar ve sekansını yaparak primerler dizayn etmişlerdir. Kalıp DNA'nın kaynağı, saflığı ve konsantrasyonu, MgCl₂ konsantrasyonu, Taq Polymerase kaynağı ve PCR aleti tipinin RAPD ve SCAR markırlarının performansı üzerine olan etkisini değerlendirmişlerdir. RAPD markırlarının SCAR'a dönüşümünde başarılı olunamadığını ve SCAR primerlerinin değişken PCR koşullarında farklı sonuçlar verdiğini belirlemişlerdir. 75 tane RAPD markırın 48 tanesinin (%64) başarılı şekilde SCAR'a çevirilebildiğini ve bunlarında 11 tanesinin (%15) orijinal RAPD-PCR ürünleri ile gözlenen polimorfizm üretebildiğini bulmuşlardır. Ayrıca bazı SCAR primerlerinin çoklu polimorfik PCR ürünü ürettiğini belirtmişlerdir. SCAR markırlarının bant yoğunluğu onların benzer RAPD markırlarından daha parlak olduğunu ve çalışılan SCAR markırları onların benzer RAPD markırlarından daha az MgCl₂ konsantrasyonundan etkilendiğini bildirmişlerdir. Taq kaynağı ve PCR aleti tipi ise SCAR ve RAPD markırlarının performansını etkilemediğini bildirmişlerdir.

Horejsi ve Staub (1999), ayrı genetik kaynaklar arasındaki ilişkiyi, elit hıyarları ayırmada RAPD markırlarının potansiyelini ve RAPD markırlarının

izoenzim ve RFLP markırlarına göre etkinliğini araştırmışlardır. Bunun için gen bankasına ilave olan 118 *C. sativus*'da 71 tane RAPD markır (42 tane haritalanan, 29 tane haritalanmamış) kullanmışlar ve genetik uzaklığı istatistiksel olarak analiz etmişlerdir. Her bir örneğin tek bir markır profiline sahip olduğunu ve bu durumda RAPD'in genotipik farklılıkta faydalı olduğunu belirtmişlerdir. Genetik kaynak grupları, bireylerin orijinleri, teorik dağılma yolları ve morfolojik karakterlerin analizinde tutarlılık gösterdiğini, elit hatlar RAPD ile ayrılabilmelerine rağmen genetik uzaklığın oldukça düşük (0.01–0.58) olduğunu tespit etmişlerdir. Bu sonuçların daha önce yapılan genetik uzaklıkla ilgili RFLP sonuçlarına, izoenzim sonuçlarından daha çok benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir.

Horejsi ve ark. (2000), hıyarda *Psuedoperonospora cubensis* (Berk.& Curt.)'e karşı dayanıklılığı kontrol eden *dm* genine karşı moleküler markır oluşturmak için WI 1983G X Straight 8 populasyonu ve Zudm1 X Straight 8 populasyonundan geliştirilen 145 F₃ bitkisi kullanmışlardır. Dayanıklılık durumunu Kuzey Amerika ve Avrupa' da 5 farklı lokasyonda gözlemlemişler ve bu bölgelerde ırk yönünden dayanıklılık için bir fark olmadığını bildirmişlerdir. 960 primerden, 135 polimorfik DNA markır tanımlanmış ve 5 markırın (G14₈₀₀, X15₁₁₀₀, AS5₈₀₀, BC519₁₁₀₀ ve BC526₁₀₀₀) *dm* genine bağlı olduğunu bildirdiler. WI 1983G X Straight 8 populasyonunda, G14₈₀₀ *dm* genine, 16,5 cM; AS5₈₀₀, 32,8 cM; BC519₁₁₀₀ 9,9 cM ve BC526₁₀₀₀ 19,2 cM uzaklıkta; Zudm1 X Straight 8 populasyonunda; G14₈₀₀ *dm* genine 20,9 cM; X15₁₁₀₀, 14,8 cM; AS5₈₀₀, 24,8 cM ve BC526₁₀₀₀, 32,9 cM uzaklıkta; G14₈₀₀ ve BC519₁₁₀₀ *dm* alleleline repulsion fazda, X15₁₁₀₀, AS5₈₀₀, ve BC526₁₀₀₀ ise *dm* genine coupling fazda bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Bradeen ve ark. (2000), *C. sativus* X *C. sativus* (dar) ve *C. sativus* X *C. sativus* var. *hardwickii* (geniş) melezlenmeleri sonucu elde edilen populasyonları JOINMAP V.2,0 programı ile haritalamışlar ve sonuçları daha önce yapılan haritalama verileriyle birleştirmişlerdir. Morfolojik özellikler, hastalığa dayanıklı lokus, izoenzim, RFLP, RAPD ve AFLP olmak üzere dar haritalama populasyonun da 255 tane, geniş haritalama populasyonunda da 197 tane markır belirlemişlerdir.

Danin-Poleg ve ark. (2000), 44 tane polimorfik SSR markırı kavun (*C. melo* L.) ve hıyarda (*C. sativus* L.) uzunluk polimorfizm için değerlendirmişlerdir. SSR

markırları üç kavun haritasına (18 tane Vedrantas X PI 161375 haritalama popülasyonunda; 23 tane Piel de sapo X PI 161375 ve 16 tane PI 414723 X Dulce) yerleştirmişlerdir. Ayrıca 14 tane SSR markır, hıyar haritalama popülasyonunda (GY14 X PI 183967) haritalamışlar ve bağlantı gruplarında yerlerini belirlemişlerdir. SSR markırları hıyar ve kavun genomu içinde rastgele dağıldığını ve 9 tane SSR markırının hem hıyarda hem de kavun genomunda yaygın olduğunu bildirmişlerdir.

Danin-Poleg ve ark. (2001), kabakgil türlerinden geliştirilen 61 tane SSR markırının 40 tanesiyle, 13 adet kavun ve 11 adet hıyar çeşitleri arasındaki uzunluk farklılıklarını araştırmışlardır. Bu SSR'lar, egzotik ve tatlı kavun grupları arasındaki farkı net şekilde belirlemiş ve ayrıca hıyarda iki alt tür olan *C. sativus* var. *sativus* ve *C. sativus* var. *hardwickii* birbirlerinden ayırabildiğini bildirmişlerdir.

Fazio ve ark. (2003), 171 tane rekombinant inbred hatları (RIL), determinate (*de*), gynoeious (*F*) ve standart boy yaprak özelliği taşıyan G421 hıyar hattı ile indeterminate, monoecious, küçük yaprak (*II*) özelliği taşıyan H-19 hıyar hatlarının melezlemesi ile geliştirmişler. 131 nokta genetik harita, RIL ve 216 F₂ bireyi 14 tane SSR, 24 tane SCAR, 27 tane AFLP, 62 tane RAPD, 1 tane SNP ve 3 ekonomik açıdan önemli özellik [*F* (gynoecy), *de* (determinate habit), *II* (küçük yaprak)] kullanılmıştır. 7 bağlantı grubu, 706 cM mesafe haritalanmış ve markırlar arası uzaklık 5,6 cM olarak belirlenmiştir. CSWCT28 SSR markırı, *F* karakterine 5,0 cM ve CSWCTT14 SSR markırı ise *de* karakterine 0,8 cM uzaklıkta olduğunu bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

Araştırma, 2001–2005 yılları arasında Antalya’da yürütülmüştür. Bu çalışmanın ana materyalini Kök-ur nematodlarına dayanıklı ve duyarlı hatların melezlenip kendilenmesiyle oluşan F₂ bireyleri ile *M. javanica* ırk 1 Kök-ur nematodu oluşturmuştur. Elde edilen F₂ bireyleri *M. javanica* ırk 1 ile test edilerek ilgili gene bağlı moleküler markırların geliştirilmesi amaçlanmıştır.

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan Kök-ur nematodlarına dayanıklı olan “Lucia”, “Manteo” ve “Shelby” olarak isimlendirilen homozigot materyaller (Recombinant Inbred Lines; RIL) North Carolina State Üniversitesi, ABD (Prof. Dr. Todd C. Wehner), homozigot duyarlı “Batem1” ve “Batem2” hatlar ise Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Antalya (Ziraat Mühendisi Ahmet Fikret Fırat)’dan sağlanmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan materyaller ve özellikleri

Materyal	Özellik
Lucia	Turşuluk hıyar, monoik (%20 dişi çiçek), koyu yeşil meyve rengine sahip, <i>M. arenaria</i> ırk 1, <i>M. arenaria</i> ırk 2 ve <i>M. javanica</i> 'ya dayanıklı
Shelby	Turşuluk hıyar, monoik (%20 dişi çiçek), koyu yeşil meyve rengine sahip, <i>M. arenaria</i> ırk 1, <i>M. arenaria</i> ırk 2 ve <i>M. javanica</i> 'ya dayanıklı
Manteo	Turşuluk hıyar, monoik (%20 dişi çiçek), koyu yeşil meyve rengine sahip, <i>M. arenaria</i> ırk 1, <i>M. arenaria</i> ırk 2 ve <i>M. javanica</i> 'ya dayanıklı
Batem1	Beith Alpha hıyar, gynoid (%100 dişi çiçekli), boğumda çiçek sayısı 2–3, belirsiz koltuk yapısında, bitki habitusu orta kuvvette, <i>M. arenaria</i> ırk 1, <i>M. arenaria</i> ırk 2 ve <i>M. javanica</i> 'ya duyarlı
Batem2	Beta Alpha hıyar, gynoid (%100 dişi çiçekli), boğumda çiçek sayısı 1, zayıf koltuk yapısına sahip, boğum araları kısa, bitki habitusu zayıf, <i>M. arenaria</i> ırk 1, <i>M. arenaria</i> ırk 2 ve <i>M. javanica</i> 'ya duyarlı

3.2 Metot

3.2.1. Dayanıklı ve Duyarlı Bitkiler Arasında Melezleme Çalışmaları

Melezleme ve kendileme çalışmaları Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Sebzecilik Biriminde seralarda Ziraat Mühendisi Ahmet Fikret Fırat tarafından yapılmıştır. Sera koşullarında dayanıklı hatlar (Lucia, Manteo ve Shelby) ile duyarlı hatlar melezlenerek (Lucia x Batem1, Shelby x Batem2, Manteo x

Batem2) F₁ bitkileri, F₁ bitkileri de kendilenerek F₂ bitkileri elde edilmiştir. Çalışmada dayanıklı materyaller anne olarak kullanılmış olup baba olarak kullanılan duyarlı materyaller gynocious çiçek yapısına sahip olduğundan Gümüş Nitrat (AgNO₃) uygulaması yapılarak cinsiyet değişimi sağlandıktan sonra melezlemeler yapılmıştır. Melezlemeler sonucu elde edilen F₁ tohumlarından geliştirilen fideler seraya dikildikten sonra kendilenerek F₂ bireyleri elde edilmiştir.

3.2.2. *Meloidogyne javanica* Irk 1 Saf Kültürünün Oluşturulması

M. javanica ırk 1, Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Nematoloji Laboratuvarında bulunan saf kültürden çoğaltılarak sağlanmıştır. Bu amaçla 15 cm çapında (1750 cm³ hacimde) içerisinde % 85 kum, % 10 mil ve % 5 toprak bulunan saksılara dikilen 10–15 cm boyuna ulaşmış duyarlı domates çeşidinin (Simita F1, Nunhems) kök boğazı etrafında açılan 2 cm derinliğindeki deliklere nematodlar (J2) inokule edilmiştir. Dişilerin oluşturduğu yumurta kümeleri binoküler altında toplanıp bunlardan geliştirilmiş Baermann-Huni yöntemi kullanılarak ikinci dönem larvalar elde edilmiştir.

3.2.3. Ebeveynler, F₁ ve F₂ Bitkilerinin *M. javanica* Irk 1 İle Testlenmesi

Ebeveynler (Lucia, Manteo, Shelby; Batem1 ve Batem2), F₁ ve F₂ tohumları kütetlere (8,5 x 28 x 43 cm ebatında) ekilmiştir. Bitkiler fide dönemine gelince içerisinde % 85 kum, % 10 mil ve % 5 toprak bulunan saksılara (15 cm) dikilmiştir. Bitkiler 2. veya 4. gerçek yapraklı duruma geldiğinde her bitkinin kök bölgesi civarında açılan deliklere ortalama 1000 adet infektiv larva (L2) inokule edilmiştir. Denemeler, 24–26 °C (gündüz) ve 20 °C (gece) sıcaklığı olan kontrollü iklim odalarında yürütülmüş ve inokulasyondan 10 hafta sonra bitkiler sökülüştür.

3.2.4. Kök Uurlanma Oranının Belirlenmesi

İnokulasyondan 10 hafta sonra bitki köklerinde oluşan ur oranları, 0–10 ur indeksi skalası (Barker, 1985) kullanılarak belirlenmiştir. Bu skalaya göre;

- 0: Kök sistemi tamamen sağlam ve hiç ur yok,
- 1: Yakın gözlemde görülebilen birkaç küçük ur var (% 1–10 ur),
- 2: Çok sayıda küçük ur bulunmakta ve daha kolay görülebilmekte (% 11–20 ur),
- 3: Uurlar çok sayıda ve bazıları birleşmiş durumda (% 21–30 ur),
- 4: Çok sayıda küçük ur, az sayıda büyük ur (% 31–40 ur),
- 5: Kök sisteminin % 25'ini kaplayan ağır urluluk durumu ve kök işlevini yapamamakta,
- 6: Kök sisteminin % 50'sini kaplayan iri uurlar, kök işlevini yapamamakta,
- 7: Kök sisteminin %75'ini kaplayan ağır urluluk durumu, kök fonksiyonunun kaybolması,
- 8: Bitkinin toprak üstü organları yeşil, kök sağlıklı değil ve beslenme durmakta,
- 9: Kök tamamıyla urlanmış ve çürümeye başlanmış,
- 10: Bitki ve kökler ölmüş.

3.2.5.Yumurta Kümesi Sayısının Belirlenmesi

Hadisoeganda ve Sasser (1982), metoduna göre bitkilerin köklerinde oluşan yumurta kümesi sayısı değerlendirilmiştir. Her bir kök sisteminde yumurta kümesi sayısı 15'den az ise bitki dayanıklı, 15'den çok ise duyarlı olarak değerlendirilmiştir.

3.2.6. Genin (*mj*) Kalıtımı

Kendileme sonucu elde edilen F₂ bireylerinin açılım oranları X² (Khi-kare) testine göre hesaplanmıştır.

3.2.7. Moleküler Çalışmalar

3.2.7.1. Bitkilerden DNA İzolasyonu

Ebeveynler ve F₂ bireylerinden DNA izolasyonu Promega DNA izolasyon Kiti (Wizard Genomic DNA Purification Kit, A1125) kullanılarak yapılmıştır.

3.2.7.2. Bulk Segregant Analysis

M. javanica ırk 1 ile test edilen F₂ bireylerinin dayanıklılık ve duyarlılıkları belirlendikten sonra Bulk Segregant Analysis (Michelmore ve ark, 1991), yöntemine göre dayanıklı ve duyarlı havuzlar oluşturulmuştur. En dayanıklı ve en duyarlı F₂ bireylerinden 10'ar tane seçilerek 2 farklı havuz oluşturulmuştur. Çalışmada havuz oluşturmada iki yöntem izlenmiştir. Birinci olarak her bir bireyden DNA izole edildikten sonra havuza eklenecek bireylerden eşit miktarda DNA alınarak havuzlar oluşturulmuştur. İkincisinde ise AFLP çalışmasında ön PCR ürünleri 1/50 oranında seyreltilmiş ve her bir örnekten (F₂ bireylerinden) aynı miktar (10 µl) alınarak dayanıklı (10 birey) ve duyarlı (10 birey) havuzlar oluşturulmuştur.

3.2.7.3. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Çizelge 3.2'de belirtilen RAPD Operon primerleri kullanılarak ebeveynler arasındaki polimorfizm araştırılmıştır.

Çizelge 3.2. RAPD primerleri ve dizimleri

Primer	Dizilim (5'-3')	Primer	Dizilim (5'-3')	Primer	Dizilim (5'-3')
A01	caggcccttc	C01	ttcgagccag	D18	gagagccaac
A05	aggggtcttg	C02	gtgaggcgtc	F19	cctctagacc
A07	gaaacgggtg	C04	ccgcatctac	G04	agcgtgtctg
A08	gtgacgtagg	C05	gatgaccgcc	G06	gtgcctaacc
A15	ttccgaacc	C06	gaacggactc	H15	aatggcgcag
A17	gaccgcttgt	C08	tggaccggtg	H16	tctcagctgg
B12	ccttgacgca	C09	ctcaccgtcc	J04	tctcagctgg
B13	ttccccgct	C11	aaagctgcgg	J11	actcctgcga
B18	ccacagcagt	C16	cacactccag	K08	gaacactggg
B19	acccccgaag	C19	gttgccagcc	Q05	ccgcgtcttg
B20	ggacccttac	D03	gtcgccgtca	Q09	ggctaaccga
V05	tccgagagg	D07	ttggcacggg	X03	tggcgcagtg
V12	acccccact				

RAPD-PCR reaksiyonu aşağıda belirtilen oranlara göre yapılmıştır.

	<u>Miktar</u>
DNA (15-30 ng)	1 µl
10xPCR Buffer (Invitrogen)	2,5 µl
Taq DNA polymerase (1 U)	0,2 µl
dNTP (5 mM)	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
RAPD primer (0,4 µM)	1 µl
dH ₂ O	<u>17,3 µl</u>
Toplam	25 µl

PCR Programı: 94 °C’de 3 dak.

94 °C’de 15 sn.	} 30 döngü
35 °C’de 15 sn.	
72 °C’de 60 sn.	
20 °C’de ∞	

PCR ürünleri, % 2’lik agaroz jelde TAE buffer yardımıyla 50 voltta 1 saat yürütülmüş ve EtBr (0,5 µg/ml) ile boyandıktan sonra UV ışığı altında değerlendirilmiştir.

3.2.7.4. Sequence Characterized Amplified Region DNA (SCAR)

Çizelge 3.3’de belirtilen SCAR primerleri kullanılarak ebeveynler ve F₂ bireyleri arasındaki polimorfizm araştırılmıştır.

Çizelge 3.3. SCAR primerleri ve dizilimleri (Horejsi ve ark., 1999)

SCAR primer	Forward (5'- 3')	Reverse (5'- 3')
SCBC469	ttgagcgaaaaatacatacc	tgacaaactttaggctgacat
SCL19	tcgaggaacatctttactt	ttattcttatgttgatcgcttgc
SCK7	ctcacgcaaagccctcaga	tagaaactcgaataatcagacag
SCAA9	cgacccgcctcacttagc	gtcttcaccggcattttg
SCAO7	tgcgagccaaatcccatct	agtggagtggagacgcagaga
SCA14	gaagtccgtgtctattattgat	attacattgtggcagctttc
SCBC403	cggatttgacggtaact	aaggctcgaggatgtgc
SCL18	atttggtattattttattc	aactcacctcaagatttaga
SCU15	atccagcgcattcttag	ttcggcggacttgcttgggtg
SCAN5	ggtattggtatgttttctatttc	ggttttacatcagccatcct
SCBC519	agatataagcgttgaggat	attatgatagattcgttttacc
SCAK5	ggtattggtatgttttctatttc	ggttttacatcagccatcct
SCK15	tcctgccaaataagaga	tgccaatcgatcctaaac
SCAO12	cctgtcatcttgctcctaactaa	ctacggataaatcacctggacctt

SCAR-PCR reaksiyonu aşağıda belirtilen oranlara göre optimize edilmiştir.

	Miktar
DNA (15-30 ng)	1 µl
10xPCR Buffer (Invitrogen)	2,5 µl
Taq DNA polymerase (1 U)	0,2 µl
dNTP (5 mM)	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
SCAR primer F (10 µM)	1 µl
SCAR primer R (10 µM)	1 µl
dH ₂ O	16,3 µl
Toplam	25 µl

PCR Programı: 94 °C'de 3 dak.

94 °C'de 30 sn.	} 30 döngü
45–62 °C'de 30 sn.	
72 °C'de 60 sn.	
20 °C'de ∞	

PCR ürünleri, % 1,5'lik agaroz jelde TAE buffer yardımıyla 60 voltta 1 saat yürütüldükten sonra EtBr ile boyanmış ve UV ışığı altında değerlendirilmiştir.

3.2.7.5. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)**3.2.7.5.(1). DNA'nın Enzimlerle Kesimi**

Ebeveynler (Lucia, Manteo, Shelby, Batem1 ve Batem2), dayanıklı-duyarlı havuzlar ve 120 F₂ bireye ait DNA örneklerinin kesilmesi aşağıda belirtilen miktarlar kullanılarak 37 °C'de 4 saat bekletilerek yapılmıştır.

	<u>Miktar</u>
DNA (250 ng)	18 µl (10 µl DNA+ 8 µl dH ₂ O)
EcoRI Enzimi (10 U/µl)	1,5 µl
MseI Enzimi (10 U/µl)	1,5 µl
NB Buffer 3 (NEB)	2,5 µl
dH ₂ O	<u>1,5 µl</u>
Toplam	25 µl

3.2.7.5.(2). Adaptörlerle Birleştirme

Kesilen her bir örnek üzerine aşağıda belirtilen oranlarda hazırlanan adaptör ligasyon solüsyonundan 24 µl ilave edilmiştir. Örnekler 70 °C'de 10 dakika, daha sonra da 37 °C'de 10 dakika tutulduktan sonra üzerine 1 µl T4 DNA ligase enzimi eklenmiş ve 20 °C'de su banyosunda 12 saat bekletilerek EcoRI ve MseI adaptörlerinin kendilerine özgü uçlara bağlanması sağlanmıştır.

	<u>Miktar</u>	
Kesilen örnekler	25 µl	
5xT4 Ligase Buffer (Invitrogen)	10 µl	} Adaptör Ligasyon Solüsyonu
EcoRI adaptör	1 µl	
MseI adaptör	1 µl	
T4 DNA ligase	1 µl	
dH ₂ O	<u>12 µl</u>	
Toplam	50 µl	

EcoRI adaptör dizisi R: 5'-aattggtacgcagtctac-3'

F: 5'-ctcgtagactgcgtacc-3'

MseI adaptör dizisi R: 5'-tactcaggactcat-3'

F: 5'-gacgatgagtcctgag-3'

Adaptör ligasyon ürünleri, ön PCR çalışmasında kullanılmak üzere 1/10 (10 µl solusyon, 90 µl TE_{0.1}) oranında seyreltilmiştir.

3.2.7.5.(3). Ön PCR

EcoRI ve MseI primerlerine 1 seçici baz ilave edilerek ön PCR yapılmıştır.

EcoRI primer + N (5'-GAC TGC GTA CCA ATT CN-3'; N: T veya A)

MseI primer + N (5'-GAT GAG TCC TGA GTA AN-3'; N: C)

	<u>Miktar</u>
DNA	2,5 µl
10xPCR Buffer (Invitrogen)	2,5 µl
Taq DNA polymerase (1 U)	0,2 µl
dNTP (5 mM)	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	0,75 µl
EcoRI primer+N (0,4 µM)	1 µl
MseI primer+N (0,4 µM)	1 µl
ddH ₂ O	<u>16,05 µl</u>
Toplam	25 µl

PCR Programı: 94 °C'de 3 dak.

94 °C'de 30 sn.	} 20 döngü
56 °C'de 30 sn.	
72 °C'de 60 sn.	
20 °C'de ∞	

PCR ürünleri % 2,5'lik agarozda 25 voltta 1 saat yürütülerek çoğalmanın olup/olmadığı kontrol edilmiştir. Ön PCR ürünlerinin çalıştığı belirlendikten sonra

diğer aşamalarda kullanılmak üzere 1/50 oranında (3 µl pre-amp DNA, 147 µl TE_{0.1}) seyreltilmiştir.

3.2.7.5.(4). Primerlerin İşaretlenmesi

Seçici PCR’da kullanılmak üzere EcoRI primeri aşağıda belirtilen miktarlar kullanılarak P³³ yardımıyla işaretlenmiştir.

	<u>Miktar</u>
EcoRI primer+NNN (54 ng)	2 µl
T4 polynucleotide kinase (10 U/ µl)	1 µl
5X Kinase Forward Buffer (Invitrogen)	1 µl
P ³³ (1 µl, 3000Ci/mmol)	<u>1 µl</u>
Toplam	5 µl
İşaretleme programı: 37 °C’ de 1 saat	
70 °C’ de 10 dakika	
20 °C’ de ∞	

3.2.7.5.(5). Seçici PCR

Ön PCR ürünleri, Çizelge 3.4’de belirtilen EcoRI-MseI primer kombinasyonlarıyla aşağıda belirtilen miktarlar kullanılarak PCR yapılmıştır.

	<u>Miktar</u>
DNA	2,5 µl
10x PCR Buffer (Invitrogen)	1 µl
EcoRI primer+ NNN (10 ng)	2 µl
MseI primer+NNN (15 ng)	2,2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	0,3 µl
dNTP (5 mM)	0,4 µl
Taq (5 U/µl)	0,2 µl
ddH ₂ O	<u>2,9 µl</u>
Toplam	10 µl

Touchdown PCR Programı: 94 °C'de 3 dak.

94 °C'de 30 sn.

65 °C'de 30 sn.

72 °C'de 60 sn.

10 döngü

Her döngüde 1 °C azalmakta

94 °C'de 30 sn.

56 °C'de 30 sn.

72 °C'de 60 sn.

25 döngü

20 °C'de ∞

Çizelge 3.4. AFLP primerleri ve dizilimleri (E: EcoRI primer, M: MseI primer)

Primer Numarası	Primer Kombinasyonu	Primer Numarası	Primer Kombinasyonu
1	E-TGC/M-CTT	51	E-TAG/M-CAC
2	E-TGC/M-CAA	52	E-TAG/M-CAG
3	E-TAC/M-CTT	53	E-TAG/M-CTGA
4	E-TAC/M-CAA	54	E-TAG/M-CAAG
5	E-TTC/M-CTT	55	E-TAG/M-CATC
6	E-TTC/M-CAA	56	E-TAG/M-CTTA
7	E-TAA/M-CTT	57	E-TCC/M-CAG
8	E-TAA/M-CAA	58	E-TCC/M-CTA
9	E-TCT/M-CTT	59	E-TCG/M-CACA
10	E-TCT/M-CAA	60	E-TCG/M-CTC
11	E-TAT/M-CTT	61	E-TCG/M-CTA
12	E-TAT/M-CAA	62	E-TCG/M-CTG
13	E-TCG/M-CTT	63	E-TCG/M-CAT
14	E-TCG/M-CAA	64	E-TCG/M-CTAC
15	E-TTG/M-CTT	65	E-TCG/M-CAC
16	E-TTG/M-CAA	66	E-TCG/M-CAG
17	E-TTT/M-CTT	67	E-TCG/M-CTGA
18	E-TTT/M-CAA	68	E-TCG/M-CAAG
19	E-TTA/M-CTT	69	E-TCG/M-CATC
20	E-TTA/M-CAA	70	E-TCG/M-CTTA
21	E-TCA/M-CTT	71	E-ACG/M-CCT
22	E-TCA/M-CAA	72	E-ACG/M-CAG
23	E-TAG/M-CTT	73	E-ACG/M-CGT
24	E-TAG/M-CAA	74	E-ACG/M-CTC
25	E-TCC/M-CTT	75	E-ACG/M-CTA
26	E-TCC/M-CAA	76	E-ACG/M-CTG
27	E-TGT/M-CTT	77	E-ACG/M-CAC
28	E-ATC/M-CTT	78	E-ACG/M-CTT
29	E-ATC/M-CAA	79	E-ACG/M-CAT
30	E-ACT/M-CTT	80	E-ACG/M-CAA
31	E-ACT/M-CAA	81	E-AAC/M-CCT
32	E-AGA/M-CTT	82	E-AAC/M-CAG
33	E-AGA/M-CAA	83	E-AAC/M-CGT
34	E-ATT/M-CTT	84	E-AAC/M-CTC
35	E-ATT/M-CAA	85	E-AAC/M-CTA
36	E-ACC/M-CTT	86	E-AAC/M-CTG
37	E-ACC/M-CAA	87	E-AAC/M-CAT
38	E-AAA/M-CTT	88	E-AAC/M-CTT
39	E-AAA/M-CAA	89	E-AAC/M-CAC
40	E-AAG/M-CTT	90	E-AAC/M-CAA
41	E-AAG/M-CAA	91	E-ACT/M-CCT
42	E-TCC/M-CTA	92	E-ACT/M-CAG
43	E-TAG/M-CCT	93	E-ACT/M-CGT
44	E-TAG/M-CAG	94	E-ACT/M-CTC
45	E-TAG/M-CGT	95	E-ACT/M-CTA
46	E-TAG/M-CTC	96	E-ATT/M-CAG
47	E-TAG/M-CTA	97	E-ATT/M-CTA
48	E-TAG /M-CTG	98	E-ATT/M-CAT
49	E-TAG/M-CAT	99	E-AAC/M-CAAG
50	E-TAG/M-CTG	100	E-AAC/M-CTGA

3.2.7.5.(6). Poliakrilamid Jel Elektroforez

Poliakrilamid jel elektroforez, Vos ve ark. (1995)'nın yönteminde değişiklikler yapılarak yürütülmüştür. Seçici PCR ürünlerin (10 µl) üzerine, 10 µl formamide dye (%98 formamide, 10 mM EDTA, % 0.025 xylene cyanol ve % 0.025 bromophenol blue) ilave edildikten sonra 94 °C'de 5 dakika tutularak DNA'ların açılması (denature) sağlanmış ve hemen buz üzerine alınmıştır. Her bir örnekten 5 µl, % 6'lık poliakrilamid jele (19:1 acrylamide:bis, 7.5 M üre, 10x TBE Buffer) yüklenmiştir. Örnekler 1 x TBE Buffer yardımı ile dikey poliakrilamid gel elektroforezde (Model S2, Life Technology) 65 watta (044 mA, 1480 V) 2,5 saat yürütülmüştür. Jel, jel kurutucuda (Gel Dryer Model 583, BioRad) 85 °C'de 2 saat kurutulduktan sonra üzerine X-ray film (Kodak BioMax) konularak oda sıcaklığında 3 gün bekletilmiştir. Film otoradiografi aletinde (Hyperprocessor Automatic Autoradiography Film Processor, Amersham Life Science) geliştirilmiştir.

3.2.7.5.(7). Gene (*mj*) Bağlı Olduğu Düşünülen AFLP Markırlarının Belirlenmesi

Çalışılan 100 EcoRI/MseI primer kombinasyonundan 92 tanesi PCR ürünü vermiştir. Bunlar arasından 2 kombinasyon (E-ATT/M-CAA ve E-AAC/M-CTG primer kombinasyonları) ebeveynler ile dayanıklı ve duyarlı havuzlar arasında farklılık göstermiştir. E-TCC/M-CTT AFLP primer kombinasyonunda ise ebeveynler arasında farklılık vermesine rağmen dayanıklı ve duyarlı havuzlar arasında farklılık göstermemiştir. Bu 3 primer kombinasyonu, havuzları oluşturan dayanıklı ve duyarlı F₂ bireylerinde analiz edilmiştir.

3.2.7.5.(8). Markırların Poliakrilamid Jelden Kesilmesi ve DNA'ların Elde Edilmesi

Ebeveynler ve havuzlar arasında polimorfizm veren bantlarla bunlara karşılık gelen F₂ bireylerindeki bantlar, Sambrook ve ark (1989)'nın Crush and Soak metoduna göre AFLP jelinden kesilmiş ve DNA'ları elde edilmiştir.

3.2.7.5.(9). Markırların PCR'ı ve Klonlanması

DNA'lar, polimorfizm veren E-ATT/M-CAA ve E-AAC/M-CTG seçici primerleriyle aşağıda belirtilen miktarlar kullanılarak PCR yapılmıştır.

	<u>Miktar</u>
DNA	2,5 µl
Buffer	1 µl
EcoRI primer+ NNN	2 µl
MseI primer+NNN	2,2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	0,3 µl
dNTP (5 mM)	0,4 µl
Taq	0,2 µl
H ₂ O	<u>2,9 µl</u>
Toplam	10 µl

PCR Programı: 94 °C'de 3 dak.

94 °C'de 30 sn.	10 döngü Her döngüde 1 °C azalmakta
65 °C'de 30 sn.	
72 °C'de 60 sn.	
94 °C'de 30 sn.	25 döngü
56 °C'de 30 sn.	
72 °C'de 60 sn.	
20 °C'de ∞	

PCR ürünleri, % 2,5'lik agaroz jelde 25 voltta 1 saat yürütülmüş ve daha sonra jelden kesilmiştir. Qiagen kiti kullanılarak PCR ürünlerinden DNA'lar elde edilmiştir. DNA'lar TOPO TA cloning kit (pCR 4-TOPO, Invitrogen) kullanılarak aşağıdaki basamaklar izlenerek klonlama yapılmıştır.

1. Vektöre klonlamanın yapılması için aşağıdaki oranlar kullanılmıştır.

DNA (PCR ürünü)	4 µl
Seyreltilmiş tuz çözeltisi	1 µl
Vektör (pCR 4-TOPO)	<u>1 µl</u>
Toplam	6 µl

2. Oda sıcaklığında 30 dakika tutularak klonlamanın gerçekleşmesi sağlanmıştır.

3. Klonlanan karışımdan alınan 2 µl'lik ürün, 30 µl competent hücrelerle birlikte elektroporasyon küvetinde (Electroporation Cuvetes, Cell Projects, EP-101 50x1 mm gap, red) birleştirildikten sonra çalkalanmış ve elektroporasyon aleti (MicroPulse, BioRad) yardımıyla *Escherichia coli*'ye aktarımı (transformasyon) gerçekleştirilmiştir.

4. Küvetlerin her biri üzerine 250 µl SOC ilave edilerek karıştırılmış ve yeni 1,5 ml'lik eppendorf tüplere aktarılmıştır.

5. 37 °C sıcaklığa sahip çalkalayıcıda 1 saat bekletildikten sonra 100 µl alınarak iki petri kabına ayrı ayrı ekim yapılmıştır.

6. Petri kapları inkübatörde 37 °C'de 1 gün bekletilerek kolonilerin gelişmesi sağlanmıştır.

7. Gelişen koloniler alınarak sıvı LB ortamına inokule edilmiş gelişmeleri için çalkalayıcıda 37 °C'de 1 gün bekletilmiştir.

8. Sıvı LB ortamında gelişen kolonilerden Qiagen Plasmid izolasyon kiti kullanılarak plasmid DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Vektöre (plasmid) klonlamanın olup/olmadığını kontrol etmek için plasmid EcoRI enzimiyle 37 °C'de 2 saat bekletilerek kesilmiştir. Daha sonra % 2,5'lik agarozda 25 voltta 1 saat yürütülmüş, EtBr ile boyandıktan sonra UV ışığı altında gözlemlenerek fotoğraflanmıştır.

Plasmid DNA	7 µl
10XBuffer	2,5 µl
EcoRI Enzimi (10U/µl)	1 µl
H ₂ O	<u>14,5 µl</u>
Toplam	25 µl

3.2.7.5.(10). Markırların Sekanslarının Yapılması ve Primerlerin Oluşturulması

Klonlanan plasmid DNA'sı, universal M13 F primeri BigDye termination kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) kullanılarak aşağıdaki oranlara göre sekans edilmiş ve sekans sonuçları ABI 377 sequencer'da yürütülmüştür.

	<u>Miktar</u>	
DNA (plasmid DNA)	1,5 µl	
5xBuffer	2 µl	
Big Dye	2 µl	
M13 F Primer (10 µM)	1 µl	
H ₂ O	<u>3,5 µl</u>	
Toplam	10 µl	
PCR Programı: 96 °C'de	15 sn	} 35 döngü
50 °C'de	10 sn	
60 °C'de	2 dak	
20 °C'de	∞	

Sekans sonuçları, Vektör NTI programı ile değerlendirilerek primerler oluşturulmuştur. Bu primerler kullanılarak; ebeveynler, havuzlar ve F₂ bireyleri aşağıdaki oranlar ile PCR yapılmıştır.

	<u>Miktar</u>
DNA (Genomik)	1 µl
10x PCR Buffer	2,5 µl
D1F primer (10 µM)	1 µl
D1R primer (10 µM)	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl
dNTP (5 mM)	1 µl
Taq (5U/µl)	0,2 µl
H ₂ O	<u>17,3 µl</u>
Toplam	25 µl

	<u>Miktar</u>
DNA (Genomic)	1 µl
10x PCR Buffer	2,5 µl
D17F primer (10 µM)	1 µl
D17R primer (10 µM)	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Taq (5U/µl)	0,2 µl
H ₂ O	<u>17,3 µl</u>
Toplam	25 µl

PCR Programı: 94 °C’de 3 dak.

94 °C’de 30 sn.	} 10 döngü Her döngüde 1 °C azalmakta
65 °C’de 30 sn.	
72 °C’de 60 sn.	
94 °C’de 30 sn.	} 25 döngü
56 °C’de 30 sn.	
72 °C’de 60 sn.	
20 °C’de ∞	

PCR ürünleri, % 2’lik agaroz jelde 25 volta 1 saat yürütüldükten sonra EtBr ile boyanmış ve UV altında değerlendirilmiştir.

3.2.7.5.(11). PCR Ürünlerinin Sekanslarının Yapılması ve Yeni Primerlerin Oluşturulması

Geliştirilen primerler ile yapılan PCR sonucu ebeveynler arasında polimorfizm belirlenememiştir. Bunun için PCR ürünleri Qiagen kiti ile temizlenerek DNA’lar elde edilmiş ve dizilimler arasında farklılık olup/olmadığını belirlemek için aşağıdaki oranlar kullanılarak sekans edilmiştir.

	<u>Miktar</u>		<u>Miktar</u>
DNA (PCR ürünü)	4 µl	DNA (PCR ürünü)	4 µl
5xBuffer	2 µl	5xBuffer	2 µl
Big Dye	2 µl	Big Dye	2 µl
Primer D1F	1 µl	Primer E-ATT	1 µl
dH ₂ O	<u>2 µl</u>	dH ₂ O	<u>2 µl</u>
Toplam	10 µl	Toplam	10 µl

	<u>Miktar</u>		<u>Miktar</u>
DNA (PCR ürünü)	4 µl	DNA (PCR ürünü)	4 µl
5xBuffer	2 µl	5xBuffer	2 µl
Big Dye	2 µl	Big Dye	2 µl
Primer D17F	1 µl	Primer E-AAC	1 µl
dH ₂ O	<u>2 µl</u>	dH ₂ O	<u>2 µl</u>
Toplam	10 µl	Toplam	10 µl

PCR Programı: 96 °C’de 2 dak.

96 °C’de 15 sn	} 35 döngü
50 °C’de 10 sn	
60 °C’de 2 dak	
20 °C’de ∞	

Sekans sonuçları Vektör NTI programı kullanılarak değerlendirilmiş ve elde edilen dizilimler karşılaştırılmıştır.

3.2.7.5.(12). Dizilim Farklılığından Yararlanılarak Geliştirilen Primerler İle PCR

D17F/D17R primerleriyle elde edilen PCR ürünleri sekansları arasında farklılık bulunamamıştır. Bununla birlikte D1F/D1R primerleri ile elde edilen PCR ürününleri sekansları ebeveynler arasında farklılık göstermiştir. Fakat bu farklılık herhangi bir kesim enziminin tanıma bölgesini içermediği için CAPS markırına

çevrilememiştir. D1F/D1R primerleriyle ebeveynler arasında farklılık oluşturulan dizilimler kullanılarak dayanıklı ve duyarlı ebeveynlere özgü iki farklı primer oluşturulmuş olup bu primerler ile ebeveynler ve F₂ bireylerinde PCR yapılmıştır.

	<u>Miktar</u>		<u>Miktar</u>
DNA (Genomic)	1 µl	DNA (Genomic)	1 µl
10x PCR Buffer	2,5 µl	10x PCR Buffer	2,5 µl
D1F primer (0,4µM)	1 µl	D1F primer (0,4µM)	1 µl
ZRR primer (0,4 µM)	1 µl	ZSR primer (0,4 µM)	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl	MgCl ₂ (25 mM)	1 µl
dNTP (5 mM)	1 µl	dNTP (5 mM)	1 µl
Taq	0,2 µl	Taq	0,2 µl
H ₂ O	<u>17,3 µl</u>	H ₂ O	<u>17,3 µl</u>
Toplam	25 µl	Toplam	25 µl

Primerlerin birleşme sıcaklıkları dikkate alınarak aşağıda belirtilen iki farklı PCR programında (touchdown PCR ve normal PCR) PCR gerçekleştirilmiştir.

PCR Programı: 94 °C'de 3 dak.

94 °C'de 30 sn.	}	10 döngü Her döngüde 1 °C azalmakta
65 °C'de 30 sn.		
72 °C'de 60 sn.		
94 °C'de 30 sn.	}	25 döngü
56 °C'de 30 sn.		
72 °C'de 60 sn.		
20 °C'de ∞		

PCR Programı: 94 °C'de 3 dak.

94 °C'de 30 sn.	}	35 döngü
50 °C'de 30 sn.		
72 °C'de 60 sn.		
72 °C'de 5 dak.		
20 °C'de ∞		

PCR ürünleri, % 2'lik agaroz jelde 50 voltta 1 saat yürütüldükten sonra EtBr ile boyanmış ve değerlendirmek için fotoğraflanmıştır.

3.2.7.5.(13). Geliştirilen ve Seçici AFLP Primerleriyle PCR

AFLP ön PCR ürünleri, geliştirilen primer ile polimorfizm veren E-ATT/M-CAA ve E-AAC/M-CTG AFLP primerleriyle aşağıda belirtilen miktarlar kullanılarak PCR yapılmıştır.

	<u>Miktar</u>
DNA (Pre-amp)	2,5 µl
10xPCR Buffer (Invitrogen)	2,5 µl
Taq DNA polymerase (1 U)	0,2 µl
dNTP (5 mM)	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
Primer D1 F (10 µM)	1 µl
Primer E-ATT (10 µM)	1 µl
dH ₂ O	<u>15,8 µl</u>
Toplam	25 µl

	<u>Miktar</u>
DNA (Pre-amp)	2,5 µl
10xPCR Buffer (Invitrogen)	2,5 µl
Taq DNA polymerase (1 U)	0,2 µl
dNTP (5 mM)	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
Primer D1 R (10 µM)	1 µl
Primer M-CAA (10 µM)	1 µl
ddH ₂ O	<u>15,8 µl</u>
Toplam	25 µl

	<u>Miktar</u>
DNA (Pre-amp)	2,5 µl
10xPCR Buffer (Invitrogen)	2,5 µl
Taq DNA polymerase (1 U)	0,2 µl
dNTP (5 mM)	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
Primer D1 F (10 µM)	1 µl
Primer M-CAA (10 µM)	1 µl
ddH ₂ O	<u>15,8 µl</u>
Toplam	25 µl

PCR Programı: 94 °C’de 3 dak.

94 °C’de 30 sn.
65 °C’de 30 sn.
72 °C’de 30 sn.

10 döngü
Her döngüde 1 °C azalmakta

94 °C’de 30 sn.
56 °C’de 30 sn.
72 °C’de 30 sn.

25 döngü

20 °C’de ∞

3.2.7.6. Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP)

Çizelge 3.5’de belirtilen SRAP primerleriyle, *mj* genine bağlı olduğu düşünülen AFLP bandının klonlanması sonucu geliştirilen D1F, D1R, D17F ve D17R primerleri eşleştirilerek SRAP yapılmıştır. Bu primerler ile öncelikle ebeveynler arasındaki farklılık incelenmiş ve elde edilen polimorfizm F₂ bireylerinde analiz edilerek genle olan ilişkisi araştırılmıştır.

Çizelge 3.5.SRAP primerleri ve dizilimleri (Budak ve ark., 2004)

SRAP Primerler	Forward (5'-3')	SRAP Primerler	Reverse (5'-3')
Me1	tgagtccaaaccggata	Em1	gactgcgtacgaattaat
Me2	tgagtccaaaccggagc	Em2	gactgcgtacgaatttgc
Me3	tgagtccaaaccgggaat	Em3	gactgcgtacgaattgac
Me4	tgagtccaaaccggacc	Em4	gactgcgtacgaatttga
Me5	tgagtccaaaccgggaag	Em5	gactgcgtacgaattaac
Me6	tgagtccaaaccggaca	Em6	gactgcgtacgaattgca
Me7	tgagtccaaaccggacg	Em7	gactgcgtacgaattcaa
Me8	tgagtccaaaccggact	Em8	gactgcgtacgaattcac
Me9	tgagtccaaaccggagg	Em9	gactgcgtacgaattcag
Me10	tgagtccaaaccggaaa	Em10	gactgcgtacgaattcat
Me11	tgagtccaaaccggaac	Em11	gactgcgtacgaattcta
Me12	tgagtccaaaccggaga	Em12	gactgcgtacgaattctc
		Em13	gactgcgtacgaattctg
		Em14	gactgcgtacgaattctt
		Em15	gactgcgtacgaattgat
		Em16	gactgcgtacgaattgtc

SRAP-PCR; aşağıdaki kombinasyonlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

SRAPF / D1F	SRAPF /D17F
SRAPF / D1R	SRAPF /D17R
SRAPR/ D1F	SRAPR /D17F
SRAPR/ D1R	SRAPR /D17R

	<u>Miktar</u>
DNA (Genomic)	2 µl
10xPCR Buffer (Invitrogen)	2,5 µl
Taq DNA polymerase (1 U)	0,2 µl
dNTP (5 mM)	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
SRAP F /R (10 pmol)	1 µl
D1F / D1R(10 pmol)	1 µl
dH ₂ O	<u>15,3 µl</u>
Toplam	25 µl

	<u>Miktar</u>
DNA (Genomik)	2 µl
10xPCR Buffer (Invitrogen)	2,5 µl
Taq DNA polymerase (1 U)	0,2 µl
dNTP (5 mM)	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
SRAP F/R (10 pmol)	1 µl
D17 F/R (10 pmol)	1 µl
dH ₂ O	<u>15,3 µl</u>
Toplam	25 µl

PCR Programı: 94 °C’de 5 dak.

94 °C’de 60 sn.	} 5 döngü
35 °C’de 60 sn.	
72 °C’de 60 sn.	
94 °C’de 60 sn.	} 35 döngü
50 °C’de 60 sn.	
72 °C’de 60 sn.	
72 °C’de 5 dak.	
20 °C’de ∞	

PCR ürünleri, % 2,5’lik agaroz da 1xTAE buffer yardımıyla 50 voltta 2 saat yürütülmüş ve ethidium bromide ile boyandıktan sonra UV ışığı altında gözlemlenerek fotoğraflanmıştır.

3.2.7.7. Markırların Analizi

SRAP forward ve reverse primerleri D1F, D1R, D17F ve D17R primerleriyle eşleştirilerek PCR yapılmıştır. Ebeveynler arasında bulunan polimorfizm F₂ bireylerinde analiz edilerek açılımına bakılmış ve elde edilen veriler MAPMAKER/EXP Version 3.0 (Lander ve ark, 1987) programı kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.7.8. Simple Sequence Repeat (SSR)

Hıyarın genetik haritasında linkage (bağlantı) yeri bilinen 23 SSR primerleri kullanılmıştır (Çizelge 3.6). Bu primerlerle ebeveynler arasındaki farklılık araştırılmış ve bulunan polimorfizm F₂ bireylerinde analiz edilmiştir.

Çizelge 3.6. SSR primerleri ve dizilimleri (Danin-Poleg ve ark., 2001)

SSR Primer	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Uzunluk (bp)
CMGA15	cggcaagacgattggcagc	atcacccgtagcgaagcacc	150
CMCT44	tcaactgtccatttctcgctg	ccgtaaagacgaaaacccttc	104
CMACC146	caaccaccgactactaagtc	cgaccaaaccatccgataa	152
CMCTT144	caaaagggttcgattgggtgg	aaatgggtgggggtgaatagg	192
CMTC47	gcataaaagaattgcagac	agaattgagaagagatagag	168
CMCCA145	gaggggaaggcagaaaccaaag	gctactttgtgggtgggtg	142
CMGA172	caatcgagatacttccacg	tgctgtcccaacgggtgcat	114
CMCT123	cggattgtactattgccaag	catgtgcatgtgtgcatgtac	106
CMGT108	ctcctcaaacattgtgtgtg	gagataggatagtaggggg	187
CMTAA166	ggaacagacacctctctgag	tccgtctacaagcgtgactgt	167
CMGA165	ctgtttcgagactatgggtg	ttcaactacagcaagggtcagc	97
CMCT160a	gtctctctcccttatctcca	acgggtgttggtgtgagaag	88
CMTC160a+b	gtctctctcccttatctcca	gatgtgtccttattgttccg	215
CMCT505	gacagtaatacctcatcaac	gggaatgtaaattggatatg	219
CSCCT15a	gtttgataatgacggattgt	gtagaaatgaaggtaggtgg	198
CSGTT15b	acctgttgattcggttctcc	agttcgggttaactaccacg	161
CSTCC813	gttggtgctgccaatagttg	caccacttctccaccgaa	144
CSCT335	ccttcacttccatctcatc	cggtccttcatttcatagac	120
CMTC51	attgggggttcttgagggtga	ccatgtctaaaaactcatgtgg	160
CSAT214	ttgagtaccattgtcatagat	ttagtttaatttcatctctgt	111
CSAT425	tagggcaggattattttcag	acggactgatttagtataggc	93
CSCCT571	ccttctgctgtttcttcttc	gaaggaaggagttaggggaag	209
CSTA050	gaattatgcagatgggtctt	caagaagatcaaatgatagc	163

SSR-PCR reaksiyonu aşağıdaki miktarlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

	Miktar
DNA	1 µl
10xPCR Buffer (Invitrogen)	2,5 µl
Taq DNA polymerase (1 U)	0,2 µl
dNTP (5 mM)	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
SSR primer F (10 pmol)	1 µl
SSR primer R (10 pmol)	1 µl
dH ₂ O	16,3 µl
Toplam	25 µl

PCR Programı: 94 °C’de 3 dak.

94 °C’de 30 sn.

51°C’de 30 sn.

72 °C’de 60 sn.

20 °C’de ∞

35 döngü

PCR ürünleri, öncelikle % 2,5’lik standart agarozda (Sigma) daha sonra da % 5’lik SFR agarozda (Amresco) 1xTAE buffer yardımıyla 50 voltta 2 saat yürütülmüştür. Jel, EtBr ile boyandıktan sonra UV ışığı altında gözlemlenerek fotoğraflanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Ebeveynler Arasında Melezleme Çalışmaları

Sera koşullarında dayanıklı hıyar hatları (Lucia, Manteo ve Shelby), duyarlı hıyar hatlarıyla melezlenerek (Lucia x Batem1, Shelby x Batem2, Manteo x Batem2) F₁ bitkileri, F₁ bitkileri de kendilenerek F₂ bitkileri elde edilmiştir. Çalışmada dayanıklı materyaller anne olarak kullanılmış olup, baba olarak kullanılan duyarlı materyaller gynoik çiçek yapısına sahip olduğundan AgNO₃ (200 ppm) uygulaması yapılarak cinsiyet değişim sağlanarak melezlemeler gerçekleştirilmiştir. Olgunlaşan meyveler hasat edilmiş ve F₁ tohumları yeni sezonda ekilmiş ve kendilenerek F₂ bitkileri elde edilmiştir.

4.2. *Meloidogyne javanica* Irk 1 Saf Kültürünün Oluşturulması

M. javanica ırk 1, Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Nematoloji Laboratuvarında bulunan saf kültürden sağlanarak duyarlı Simita F₁ (Nunhems Tohum) domates tohumlarında çoğaltılmıştır. Ön denemelerde yürütülen çalışmalarda *M. javanica* ırk 1'in Simita F1 domates çeşidi üzerinde geliştiği ve çok yumurta paketi verdiği için bu çeşit kültürleri çoğaltmada tercih edilmiştir.

4.3. Ebeveynler, F₁ ve F₂ Bireylerinin *M. javanica* Irk 1 ile Testlenmesi

Ebeveynler, F₁ ve F₂ bireylerinin dayanıklılık ve dayanlılıklarını belirlemek için *M. javanica* ırk 1 ile testlenmiştir.

Duyarlı materyaller, Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde hıyar ıslah programında geliştirilen saf hatlardır. Çalışmada öncelikli olarak melezlemede kullanılacak olan duyarlı materyallerin *M. javanica* ırk 1 ırkına karşı olan dayanıklılık durumu araştırılmıştır. Duyarlı ebeveynlerin *M. javanica* ırk 1 ile testleme sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Duyarlı bitkilerin (Batem1 ve Batem2) ur indeksi 4–7 arasında, yumurta kümesi ise 15'in üzerinde bulunmuştur. Duyarlı

ebeveynlerin *M. javanica* ırk 1 ile testlemesiyle oluşan yumurta kümesi sayıları testlemeye alınan bütün örneklerde 15'in üzerinde görülmüştür.

Çizelge 4.1. Duyarlı ebeveynlerin *M. javanica* ırk 1 ile testlenmesi sonucu köklerde oluşan ur indeksi ve yumurta kümesi sayıları

Ebeveyn	Ur İndeksi	Yumurta Kümesi (Adet)	Ebeveyn	Ur İndeksi	Yumurta Kümesi (Adet)
Batem1	5	>15	Batem2	4	>15
Batem1	6	>15	Batem2	6	>15
Batem1	5	>15	Batem2	5	>15
Batem1	4	>15	Batem2	6	>15
Batem1	7	>15	Batem2	6	>15
Batem1	7	>15	Batem2	7	>15
Batem1	5	>15	Batem2	5	>15
Batem1	7	>15	Batem2	5	>15
Batem1	4	>15	Batem2	6	>15
Batem1	5	>15	Batem2	4	>15
Batem1	5	>15	Batem2	6	>15
Batem1	6	>15	Batem2	7	>15
Batem1	6	>15	Batem2	7	>15
Batem1	5	>15	Batem2	4	>15
Batem1	4	>15	Batem2	5	>15
Batem1	5	>15	Batem2	7	>15
Batem1	6	>15	Batem2	6	>15
Batem1	6	>15	Batem2	4	>15
Batem1	4	>15	Batem2	7	>15
Batem1	5	>15	Batem2	6	>15

Kök-ur nematodlarına karşı dayanıklılığı (*M. javanica*, *M. arenaria* ırk 1 ve *M. arenaria* ırk 2) kontrol eden *mj* genini taşıyan Lucia, Manteo ve Shelby saf hatları Doğu Akdeniz Bölgesi'nde daha önceki çalışmalarda belirlenen *M. javanica* ırk 1 ile test edilerek dayanıklılık durumu belirlenmiştir. Bazı durumlarda dayanıklılık kaynakları aynı türün içindeki farklı popülasyonlarına değişik verdiği için kontrol testlemesi yapılmıştır.

Dayanıklı ebeveynlerin *M. javanica* ırk 1 ile testleme sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir. Dayanıklı bitkilerin ur indeksi 1, yumurta kümesi ise 0 (sıfır) bulunmuştur. Dayanıklı üç ebeveyn (Lucia, Shelby ve Manteo) aynı gene (*mj*) sahip olduğu için ur indeksi ve yumurta kümesi sayıları aynı görülmüştür.

Çizelge 4.2. Dayanıklı ebeveynlerin *M. javanica* ırk 1 ile testlenmesi sonucu köklerde oluşan ur indeksi ve yumurta kümesi sayıları

Ebeveyn	Ur indeksi	Yumurta Kümesi	Ebeveyn	Ur indeksi	Yumurta Kümesi	Ebeveyn	Ur indeksi	Yumurta Kümesi
Lucia	1	0	Shelby	1	0	Manteo	1	0
Lucia	1	0	Shelby	1	0	Manteo	1	0
Lucia	1	0	Shelby	1	0	Manteo	1	0
Lucia	1	0	Shelby	1	0	Manteo	1	0
Lucia	1	0	Shelby	1	0	Manteo	1	0
Lucia	1	0	Shelby	1	0	Manteo	1	0
Lucia	1	0	Shelby	1	0	Manteo	1	0
Lucia	1	0	Shelby	1	0	Manteo	1	0
Lucia	1	0	Shelby	1	0	Manteo	1	0
Lucia	1	0	Shelby	1	0	Manteo	1	0
Lucia	1	0	Shelby	1	0	Manteo	1	0
Lucia	1	0	Shelby	1	0	Manteo	1	0
Lucia	1	0	Shelby	1	0	Manteo	1	0
Lucia	1	0	Shelby	1	0	Manteo	1	0
Lucia	1	0	Shelby	1	0	Manteo	1	0
Lucia	1	0	Shelby	1	0	Manteo	1	0
Lucia	1	0	Shelby	1	0	Manteo	1	0
Lucia	1	0	Shelby	1	0	Manteo	1	0
Lucia	1	0	Shelby	1	0	Manteo	1	0
Lucia	1	0	Shelby	1	0	Manteo	1	0
Lucia	1	0	Shelby	1	0	Manteo	1	0
Lucia	1	0	Shelby	1	0	Manteo	1	0

Dayanıklı hatlar ile duyarlı hatların melezlenmeleri sonucu elde edilen F_1 bitkilerinin *M. javanica* ırk 1 ile testleme sonuçları Çizelge 4.3’de gösterilmiştir. Burada görüldüğü gibi F_1 bitkilerinin hepsinin ur indeksi 4 ve 4’den büyük, yumurta kümesi sayısı da 15’den büyük bir başka ifade ile *M. javanica* ırk 1’e duyarlı bulunmuştur. Walters ve ark (1997), *M. javanica*’ya dayanıklı *C. sativus* var. *hardwickii* LJ 90430 ile bu nematoda hassas hıyar hatlarının (Sumter, Addis, Gy 14, Gy 57u ve Poinsett) melezlemeleri sonucu elde edilen F_1 , F_2 ve BC_1 bireyleri üzerine yaptıkları testleme çalışmalarında, *M. javanica*’ya dayanıklılığın resesif tek gen tarafından kontrol edildiğini bildirmişlerdir. Çalışmada kullanılan Lucia, Shelby ve Manteo saf hatları *C. sativus* var. *hardwickii* LJ 90430 materyalindeki dayanıklılık kaynağının *C. sativus* var. *sativus* varyetelerine aktarılması sonucu geliştirilmiştir. Bu nedenle *mj* geni taşıyan bu hatların oluşturdukları F_1 bitkilerinin hepsinin teorik olarak duyarlı olması beklenmektedir ki elde edilen sonuçlar bu bilgilerle paralellik göstermiştir.

Çizelge 4.3. Dayanıklı ve duyarlı ebeveynlerin melezlemeleri sonucu elde F₁ bireylerin *M. javanica* ırk 1 ile testlenmesi sonucu köklerde oluşan ur indeksi ve yumurta kümesi sayıları

Lucia X Batem1	Ur indeksi	Yumurta Kümesi (Adet)	Shelby X Batem2	Ur indeksi	Yumurta Kümesi (Adet)	Manteo X Batem2	Ur indeksi	Yumurta Kümesi (Adet)
LxB ₁	6	>15	SxA ₁	5	>15	MxA ₁	5	>15
LxB ₂	5	>15	SxA ₂	6	>15	MxA ₂	4	>15
LxB ₃	5	>15	SxA ₃	5	>15	MxA ₃	6	>15
LxB ₄	5	>15	SxA ₄	6	>15	MxA ₄	5	>15
LxB ₅	4	>15	SxA ₅	4	>15	MxA ₅	6	>15
LxB ₆	5	>15	SxA ₆	6	>15	MxA ₆	5	>15
LxB ₇	6	>15	SxA ₇	7	>15	MxA ₇	4	>15
LxB ₈	6	>15	SxA ₈	7	>15	MxA ₈	5	>15
LxB ₉	5	>15	SxA ₉	4	>15	MxA ₉	2	>15
LxB ₁₀	4	>15	SxA ₁₀	6	>15	MxA ₁₀	4	>15
LxB ₁₁	5	>15	SxA ₁₁	6	>15	MxA ₁₁	6	>15
LxB ₁₂	4	>15	SxA ₁₂	5	>15	MxA ₁₂	7	>15
LxB ₁₃	7	>15	SxA ₁₃	4	>15	MxA ₁₃	7	>15
LxB ₁₄	4	>15	SxA ₁₄	6	>15	MxA ₁₄	4	>15
LxB ₁₅	5	>15	SxA ₁₅	5	>15	MxA ₁₅	5	>15
LxB ₁₆	5	>15	SxA ₁₆	5	>15	MxA ₁₆	5	>15
LxB ₁₇	5	>15	SxA ₁₇	6	>15	MxA ₁₇	4	>15
LxB ₁₈	4	>15	SxA ₁₈	6	>15	MxA ₁₈	6	>15
LxB ₁₉	5	>15	SxA ₁₉	5	>15	MxA ₁₉	5	>15
LxB ₂₀	7	>15	SxA ₂₀	4	>15	MxA ₂₀	7	>15

Lucia x Batem1'nin melezlenmesiyle elde edilen F₁ bitkilerinin kendilenmesi sonucu oluşan F₂ bireylerinin *M. javanica* ırk 1 ile testlenmiştir. Testlenen 100 bitkiden 27 tanesinin dayanıklı, 73 tanesinin ise duyarlı olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.4)

Shelby x Batem2'nin melezlenmesiyle elde edilen F₁ bitkilerinin kendilenmesi sonucu oluşan F₂ bireylerinin *M. javanica* ırk 1 ile testlenmiştir. Testlemeye alınan 100 bitkiden 22 tanesinin dayanıklı, 78 tanesinin ise duyarlı olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.5).

Manteo x Batem2'nin melezlenmesiyle elde edilen F₁ bitkilerinin kendilenmesi sonucu oluşan F₂ bireylerinin *M. javanica* ırk 1 ile testlenmiştir. Testlenen 100 bitkiden 21 tanesinin dayanıklı, 79 tanesinin ise duyarlı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6)

Çizelge 4.4. F₂ bireylerinin (Lucia x Batem1) *M. javanica* ırk 1 ile testlenmesi sonucu köklerde oluşan ur indeksi ve yumurta kümesi sayıları

F ₂ Bireyleri	Ur indeksi	Yumurta Kümesi	F ₂ Bireyleri	Ur indeksi	Yumurta Kümesi
100	4	>15	151	6	>15
101	1	8	152	1	0
102	2	5	153	2	7
103	6	>15	154	6	>15
104	6	>15	155	4	>15
105	2	0	156	2	3
106	2	7	157	4	>15
107	5	>15	158	5	>15
108	5	>15	159	4	>15
109	4	>15	160	4	>15
110	6	>15	161	4	>15
111	7	>15	162	5	>15
112	1	8	163	5	>15
113	5	>15	164	5	>15
114	4	>15	165	5	>15
115	4	>15	166	6	>15
116	5	>15	167	4	>15
117	1	0	168	3	0
118	2	>15	169	6	>15
119	5	>15	170	6	>15
120	6	>15	171	6	>15
121	1	12	172	1	>15
122	2	0	173	5	>15
123	6	>15	174	5	>15
124	1	6	175	5	>15
125	6	>15	176	1	2
126	1	>15	177	5	>15
127	2	2	178	6	>15
128	5	>15	179	7	>15
129	5	>15	180	1	0
130	7	>15	181	5	>15
131	2	>15	182	2	0
132	7	>15	183	7	>15
133	7	>15	184	6	>15
134	6	>15	185	5	>15
135	3	>15	186	2	5
136	5	>15	187	4	>15
137	5	>15	188	7	>15
138	3	>15	189	2	6
139	2	0	190	5	>15
140	5	>15	191	2	0
141	2	>15	192	1	>15
142	8	>15	193	7	>15
143	7	>15	194	2	4
144	3	4	195	3	0
145	5	>15	196	6	>15
146	5	>15	197	5	>15
147	2	>15	198	2	12
148	6	>15	199	5	>15
149	1	0	1000	2	9
150	5	>15			

Çizelge 4.5. F₂ bireylerinin (Shelby x Batem2) *M. javanica* ırk 1 ile testlenmesi sonucu köklerde oluşan ur indeksi ve yumurta kümesi sayıları

F ₂ Bireyleri	Ur İndeksi	Yumurta Kümesi	F ₂ Bireyleri	Ur İndeksi	Yumurta Kümesi
200	4	>15	251	2	0
201	5	>15	252	1	0
202	6	>15	253	4	>15
203	2	1	254	6	>15
204	6	>15	255	4	>15
205	2	7	256	5	>15
206	5	>15	257	4	>15
207	2	0	258	5	>15
208	2	1	259	4	>15
209	4	>15	260	4	>15
210	6	>15	261	4	>15
211	7	>15	262	5	>15
212	4	>15	263	7	>15
213	4	>15	264	6	>15
214	5	>15	265	2	6
215	3	0	266	5	>15
216	2	0	267	6	>15
217	4	>15	268	3	0
218	5	>15	269	4	>15
219	5	>15	270	5	>15
220	7	>15	271	6	>15
221	6	>15	272	5	>15
222	2	0	273	6	>15
223	5	>15	274	5	>15
224	6	>15	275	2	5
225	4	>15	276	4	>15
226	5	>15	277	6	>15
227	1	0	278	4	>15
228	6	>15	279	6	>15
229	5	>15	280	4	>15
230	7	>15	281	1	0
231	6	>15	282	2	0
232	4	>15	283	6	>15
233	4	>15	284	4	>15
234	6	>15	285	5	>15
235	4	>15	286	4	>15
236	6	>15	287	4	>15
237	6	>15	288	5	>15
238	3	0	289	5	>15
239	5	>15	290	6	>15
240	3	0	291	5	>15
241	4	>15	292	6	>15
242	1	0	293	7	>15
243	2	0	294	2	7
244	5	>15	295	6	>15
245	1	4	296	5	>15
246	5	>15	297	5	>15
247	5	>15	298	4	>15
248	5	>15	299	3	0
249	6	>15	2000	4	>15
250	5	>15			

Çizelge 4.6. F₂ bireylerinin (Manteo x Batem2) *M. javanica* ırk 1 ile testlenmesi sonucu köklerde oluşan ur indeksi ve yumurta kümesi sayıları

F ₂ Bireyleri	Ur İndeksi	Yumurta Kümesi	F ₂ Bireyleri	Ur İndeksi	Yumurta Kümesi
300	6	>15	251	5	>15
301	6	>15	252	5	>15
302	6	>15	253	5	>15
303	4	>15	254	4	>15
304	6	>15	255	2	0
305	2	6	256	4	>15
306	6	>15	257	4	>15
307	6	>15	258	6	>15
308	5	>15	259	5	>15
309	4	>15	260	5	>15
310	2	0	261	6	>15
311	7	>15	262	5	>15
312	6	>15	263	2	4
313	6	>15	264	6	>15
314	5	>15	265	5	>15
315	3	0	266	5	>15
316	5	>15	267	3	7
317	5	>15	268	5	>15
318	4	>15	269	6	>15
319	4	>15	270	4	>15
320	6	>15	271	5	>15
321	2	0	272	3	8
322	5	>15	273	6	>15
323	6	>15	274	5	>15
324	6	>15	275	5	>15
325	5	>15	276	5	>15
326	4	>15	277	1	0
327	4	>15	278	5	>15
328	4	>15	379	6	>15
329	5	>15	380	1	0
330	4	>15	381	5	>15
331	5	>15	382	4	>15
332	3	5	383	6	>15
333	5	>15	384	4	>15
334	5	>15	385	6	>15
335	3	6	386	2	9
336	7	>15	387	2	0
337	5	>15	388	4	>15
338	4	>15	389	4	>15
339	2	0	390	3	0
340	3	0	391	6	>15
341	5	>15	392	6	>15
342	5	>15	393	2	7
343	4	>15	394	5	>15
344	1	4	395	6	>15
345	5	>15	396	5	>15
346	5	>15	397	5	>15
347	4	>15	398	3	0
348	4	>15	399	5	>15
349	5	>15	3000	4	>15
350	1	0			

4.4. *mj* Geninin Kalıtımı

Ebeveynler ile F₁ ve F₂ bitkilerinin *M. javanica* ırk 1 ile testlenmesiyle elde edilen veriler Çizelge 4.7’de görülmektedir. Testlemeye alınan duyarlı ebeveynlerin tamamı duyarlı, dayanıklı ebeveynlerin tamamı da dayanıklı oldukları, dayanıklı ve duyarlı ebeveynlerin melezlenmeleri sonucu elde edilen F₁ bitkilerinin ise duyarlı olduğu bulunmuştur. F₁ bitkilerinin kendilenmesi sonucu elde edilen F₂ bireylerinin açılım oranları X² (Khi-kare) testine göre hesaplanmıştır. Bulunan X² değerleri 3.841’den küçük olduğu için aralarındaki farkın önemsiz ve genin 3:1 açılım oranının olduğu belirlenmiştir. Walters ve ark (1997), *M. javanica*’ya dayanıklı *C. sativus* var. *hardwickii* LJ 90430 ile bu nematoda duyarlı hıyar hatlarının (Sumter, Addis, Gy 14, Gy 57u ve Poinsett) melezlemeleri sonucu elde edilen F₁, F₂ ve BC₁ bireyleri üzerine yaptıkları testleme çalışmalarında, *M. javanica*’ya dayanıklılığın resesif tek gen tarafından sağlandığı bildirilmiş ve bunu *mj* geni olarak isimlendirmişlerdir. Walters ve Wehner (1997), *C. sativus* var. *hardwickii* LJ 90430 ile farklı özelliklere sahip hıyar hatlarının melezlemeleri sonucu geliştirdikleri rekombinat inbred “Lucia”, “Manteo” ve “Shelby” hıyar hatlarının *M. arenaria* ırk 1, *M. arenaria* ırk 2 ve *M. javanica*’ya dayanıklı olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen veriler önceki çalışmalarda elde edilen bulgularla paralellik göstermiştir.

Çizelge 4.7. Ebeveynlerin, F₁ ve F₂ bireylerinin *M. javanica* ırk 1 ile testleme sonuçları

Ebevenler ve Generasyon	Gözlenen D:H	Beklenen D:H	Açılım oranı	X ²
Batem1	0:20	0:20	Hepsi duyarlı	-
Batem2	0:20	0:20	Hepsi duyarlı	-
Lucia	20:0	20:0	Hepsi dayanıklı	-
Shelby	20:0	20:0	Hepsi dayanıklı	-
Manteo	20:0	20:0	Hepsi dayanıklı	-
F ₁ (Lucia x Baba)	0:20	0:20	Hepsi duyarlı	-
F ₁ (Shelby x Ana)	0:20	0:20	Hepsi duyarlı	-
F ₁ (Manteo x Ana)	0:20	0:20	Hepsi duyarlı	-
F ₂ (Lucia x Baba)	27:73	25:75	3:1	0.16
F ₂ (Shelby x Ana)	22:78	25:75	3:1	0.36
F ₂ (Manteo x Ana)	21:79	25:75	3:1	0.64

D: Dayanıklı

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

H: Hassas (Duyarlı), S.D=1, P ≤ 0.05

4.5. RAPD Moleküler Markır Bulguları

Bu çalışmada hıyar da Kök-ur nematodlarına karşı dayanıklılığı kontrol eden *mj* genine bağlı markır belirlemede asıl amacın AFLP markır sistemini oluşturmak olmasına rağmen başlangıç olarak laboratuarda mevcut bulunan RAPD primerleri kullanarak dayanıklı ve duyarlı ebeveynler arasında farklılık olup/olmadığı araştırılmıştır. Çizelge 4.8’de görüldüğü gibi 37 RAPD primeriyle çalışılmış olup, bunlardan 26 tanesinde PCR ürünü elde edilmesine rağmen, 11 primer de ise elde edilememiştir. PCR ürünü veren 26 RAPD primerinde her bir ebeveynde 104 DNA bandı gözlemlenmiş fakat polimorfizm belirlenenememiştir.

Çizelge 4.8. Çalışmada kullanılan RAPD primerleri ve PCR sonuçları

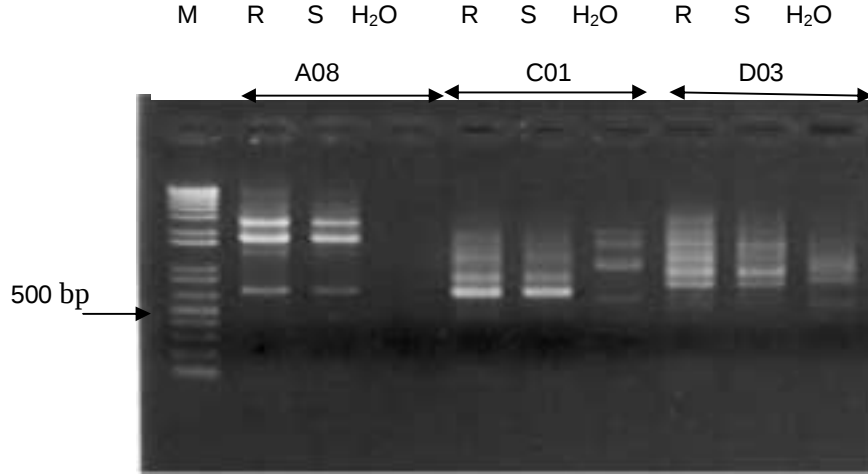
Primer Adı	PCR	Farklılık	Primer Adı	PCR	Farklılık	Primer Adı	PCR	Farklılık
A01	+	x	C01	+	x	D18	-	-
A05	+	x	C02	+	x	F19	-	-
A07	+	x	C04	+	x	G04	+	x
A08	+	x	C05	-	-	G06	+	x
A15	+	x	C06	-	-	H15	+	x
A17	-	-	C08	+	x	H16	+	x
B12	+	x	C09	+	x	J04	+	x
B13	-	-	C11	+	x	J11	+	x
B18	-	-	C16	+	x	K08	+	x
B19	-	-	C19	+	x	Q05	+	x
B20	-	-	D03	+	x	Q09	+	x
V05	-	-	D07	-	-	X03	+	x
V12	+	-						

+: PCR çalıştı

-: PCR çalışmadı

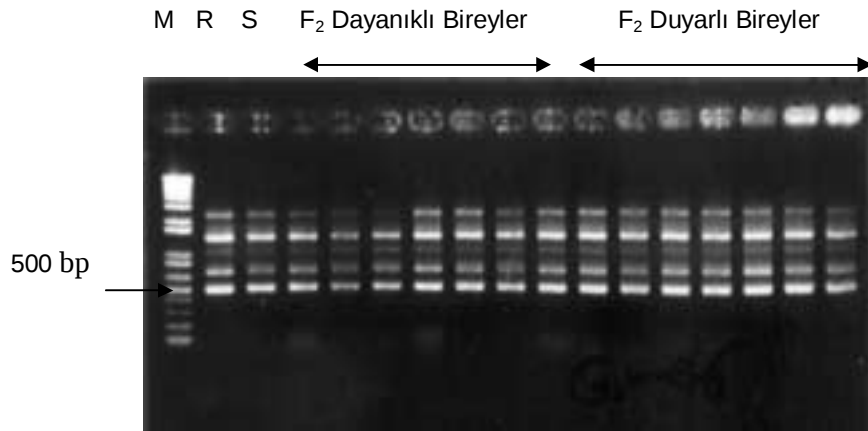
x: Farklılık (polimorfizm) yok

A08, C01 ve D03 RAPD primerleriyle yapılan PCR ürünleri Şekil 4.1’de görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi A08 ve C01 primeriyle 3, D03 primeriyle ise 4 DNA bandı elde edilmiştir. Bu üç primer kombinasyonu dayanıklı ve duyarlı ebeveynler arasında polimorfizm vermemiştir.



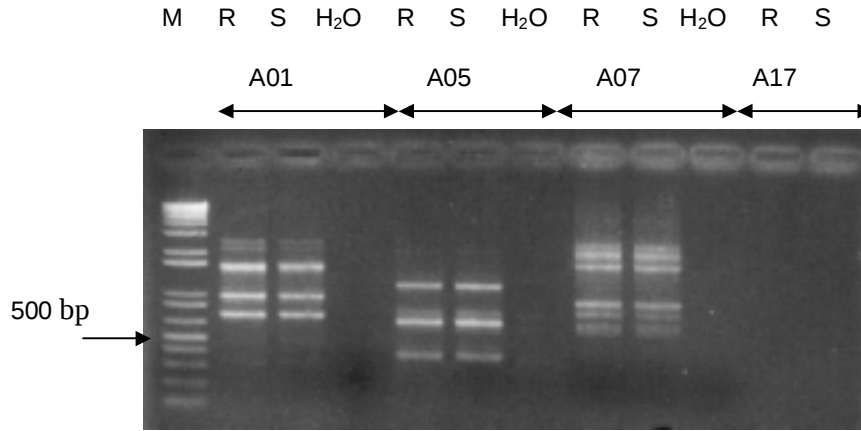
Şekil 4.1. A08, C01 ve D03 primerleriyle elde edilen PCR ürünleri
Markır (1 kb), R: Dayanıklı ebeveyn (Lucia), S: Duyarlı ebeveyn (Batem1)

G06 RAPD primeriyle yapılan PCR sonuçları Şekil 4.2’de gösterilmiştir. G06 RAPD primeri hem ebeveynler (R ve S) hem de F₂ bireylerinde 5 adet DNA bandı vermiş fakat elde edilen bantların hepsi monomorfik bulunmuştur.



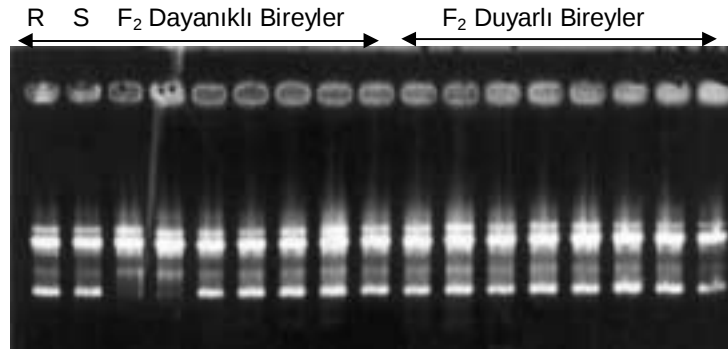
Şekil 4.2. G06 RAPD primerleriyle elde edilen PCR ürünleri
M: Markır (1 kb), R: Dayanıklı ebeveyn (Lucia), S: Duyarlı ebeveyn (Batem1)

A01, A05, A07 ve A17 RAPD primerleriyle yapılan PCR ürünleri Şekil 4.3'de görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi A01 primeriyle 5, A05 primeriyle 4 ve A07 primeriyle 6 DNA bandı elde edilmiştir. Üç (3) RAPD primer kombinasyonu sonucu elde edilen bantların hepsinin monomorfik olduğu görülmüştür. A17 primeri ise her iki ebeveynde de çalışmadığı için PCR ürünü elde edilememiştir.



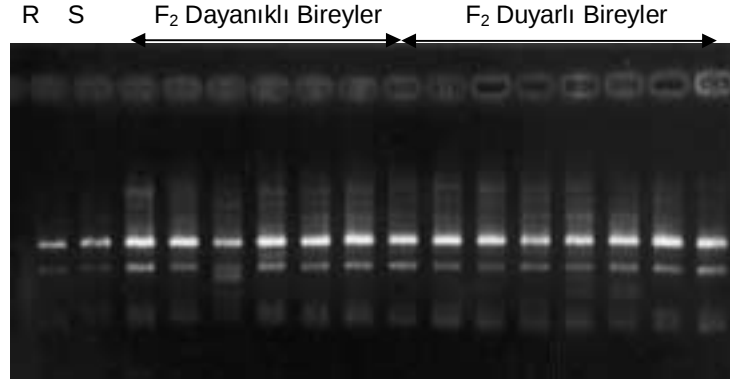
Şekil 4.3. A01, A05, A07 ve A17 RAPD primerleriyle elde edilen PCR ürünleri
M: Markır (1 kb), R: Dayanıklı ebeveyn (Lucia), S : Duyarlı ebeveyn (Batem1)

C06 RAPD primeriyle yapılan PCR sonuçlarında görüldüğü gibi hem ebeveynler (R ve S) hem de F₂ bireylerinde 4 adet DNA bandı elde edilmiştir (Şekil 4.4). Bununla birlikte bantların hepsi monomorfik bulunmuş ve ebeveynler arasında polimorfizm elde edilememiştir.



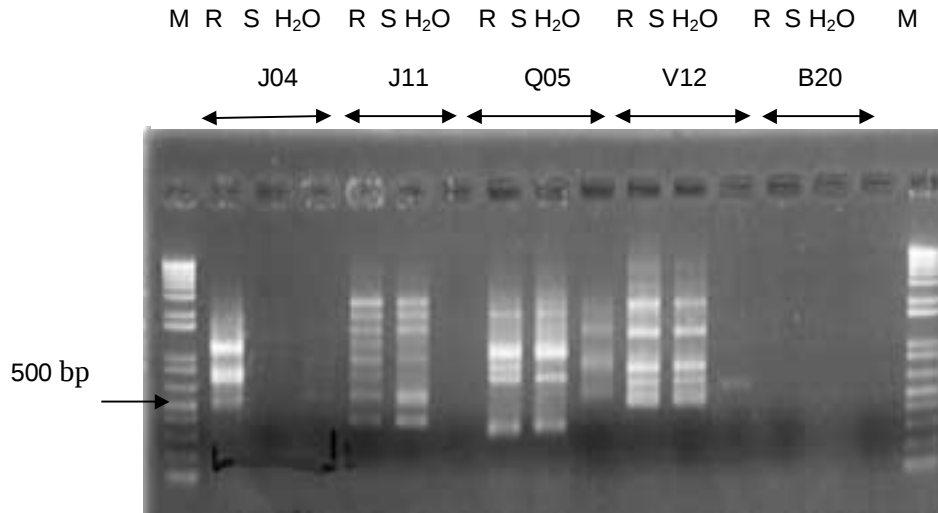
Şekil 4.4. C06 RAPD primerleriyle elde edilen PCR ürünleri
M: Markır (1 kb), R: Dayanıklı ebeveyn (Lucia), S: Duyarlı ebeveyn (Batem1)

Q05 RAPD primeriyle yapılan PCR sonuçlarına göre hem ebeveynler (R ve S) hem de F₂ bireylerinde 2 tane DNA bandı elde edilmiş, fakat aralarında farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Q05 RAPD primeriyle elde edilen PCR ürünleri
R: Dayanıklı ebeveyn (Lucia), S: Duyarlı ebeveyn (Batem1)

J04, J11, Q05, V12 ve B20 RAPD primerleri sonucu elde edilen PCR ürünleri Şekil 4.6'da görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi J04, J11, Q05 ve V12 primerlerinde PCR ürünü elde edilmiş, buna karşılık B20 primerinde ise PCR ürünü elde edilememiştir. J04 primerinde ilk PCR'da duyarlı ebeveynde DNA elde edilmemiş fakat PCR ikinci kez tekrarlanınca PCR çalışmış fakat ebeveynler arasında polimorfizm bulunamamıştır. Q05 RAPD primeriyle yapılan PCR da ise R ve S bireyler karşılaştırıldığında, R ebeveynde farklı bir bant bulunmasına karşılık iki defa PCR yapıldığında bu bant elde edilemediğinden başlangıçta gözlenen polimorfizm kullanılamamıştır. J11 ve V12 primerleriyle ebeveynleri 5'er adet DNA bandı elde edilmesine rağmen ebeveynler arasında farklılık gözlemlenememiştir. B20 RAPD primerinde ise her iki ebeveynde de PCR çalışmadığından DNA ürünü elde edilememiştir.



şekil 4.6. J04, J11, Q05, V12 ve B20 RAPD primerleriyle elde edilen PCR ürünleri
M: Markır, R: Dayanıklı ebeveyn (Lucia), S: Duyarlı ebeveyn (Batem1)

4.6. RAPD Moleküler Markır Tartışma

RAPD markırları, 1990'lı yıllarda geliştirilen PCR'a dayalı bir DNA parmak izi metodudur (Williams ve ark., 1990). Teknik temelde DNA'nın 10 bazlık oligonükleotid primerleriyle PCR yapılması ve elde edilen PCR ürünlerinin jel elektroforezine dayanmaktadır. Sistemi uygulamanın kolay olması, radyoaktif madde kullanılmaması, maliyetinin diğerk markır sistemlerine göre düşük olması, sekans bilgisine ihtiyaç duyulmaması, kısa sürede çok örneğın analiz edilebilmesi ve çok az miktarda DNA'nın (5–30 ng) kullanılması tekniğın avantajı olarak görölmektedir. Bununla birlikte elde edilen sonuçların tekrarlanabilirliğının zayıf olması ve dominant markır yapısına sahip olması ise tekniğın dezavantajını oluşturmaktadır. RAPD markırlarının bahsedilen avantajlarından dolayı bitkilerin genetik haritalarının yapılmasında (Kennard ve ark., 1994; Kesseli ve ark., 1994), marker yardımcı seleksiyonda arzu edilen karakterin belirlenmesinde (Martin ve ark., 1991; Michelmores ve ark., 1991; Paran ve Michelmores, 1993) ve populasyon ve filogenetik çalışmalarda (Wilkes ve ark., 1993; Yu ve Pauls, 1993) yoğun şekilde kullanılmaktadır.

Kullanılan her RAPD primeri için oluşan PCR ürünleri iki grup içerisinde incelenmekte olup; bunlar değişken olmayanlar (monomorfik) ve değişken olanlar (polimorfik) olarak adlandırılmaktadırlar. Değişken olanlar nükleotidlerdeki inversion (ters dönme), delesion (silme) ve primer bağlanma bölgelerindeki nükleotid değişikliğinden kaynaklanmaktadır.

Protein ve DNA markırları, öncelikle hıyar genotipleri arasındaki farklılıkları araştırmak amacıyla kullanılmaya başlanmıştır (Dijkhuizen ve ark., 1996; Knerr ve ark., 1989; Meglic ve Staub, 1996a, Meglic ve Staub, 1996b; Meglic ve ark., 1996; Staub ve Meglic 1993; Staub ve ark., 1996a; Staub ve ark., 1996b; Staub ve ark., 1996c; Staub ve ark., 1997a; Staub ve ark., 1997b). İzoenzim markırları ile farklı hıyar genetik kaynaklarını analiz etmek için yapılan çalışmada 21 farklı genetik lokus (Knerr ve ark, 1989; Staub ve ark, 1997a), RFLP ile yapılan çalışmada ise izoenzimden daha fazla farklı genetik lokus belirlenebilmiştir (Dijkhuizen ve ark., 1996; Kennard ve ark., 1994). Bununla birlikte RFLP marker sisteminin bu tür çalışmalar için kullanımının zor ve bazı güçlükler taşıdığı bildirilmiştir (Waugh ve Powell, 1992). Buna karşın RAPD markırları, dominant özellik taşımakla birlikte uygulama kolaylığından ve çoklu lokus olmasından dolayı genetik analiz çalışmalarında yoğun şekilde kullanılmış olup izoenzim ve RFLP'den daha fazla farklı bölge tanımlamıştır (Rafalski ve Tingey, 1993; Waugh ve Powell, 1992).

RAPD tekniğinin uygulaması kolaydır. Ancak bu teknikte bazı problemlerle karşılaşmak mümkün olmaktadır. Çalışılan doku kaynağındaki değişmeler, DNA izolasyon protokolü, PCR koşullarındaki farklılıklar, çalışılan dokunun mikroorganizmalar ile bulaşık olması gibi nedenlerden dolayı belirlenen bandı tekrar elde etmek bazen zor olmaktadır (Staub ve ark., 1996c). RAPD markırlarının, SCAR markırlarına dönüştürölmesiyle karşılaşılan bu sorunlar azaltılabilmektedir. Ancak bu işlem nispeten pahalı, zaman almakta ve her RAPD markırları kolayca SCAR'a çevrilememektedir (Horejsi ve ark., 1999). Bunun dışında bir türde alışan RAPD primerlerinin başka bir türde çalışmaması da bir diğer olumsuzluk olarak görölmektedir.

Hıyar genotipleri arasında yapılan çalışmalarda genetik varyasyonun oldukça az olduğu görölmüştür. Kennard ve ark (1994), birbirlerine yakın ve uzak olan ticari

hıyar çeşitlerinde RFLP marker sistemi kullanarak yaptıkları çalışmada polimorfizm oranını % 3–9 olarak belirlemişlerdir. Horejsi ve Staub (1999), RAPD markırı ile gen kaynakları havuzuna eklenen elit hıyarlar üzerine yaptıkları çalışmada genetik uzaklıkları oldukça düşük (0.01–0.058) bulmuşlardır. Dijkhuizen ve ark (1996), 40 RFLP markeri ile 6 Avrupa uzun meyveli elit hıyarını ayıramamıştır. Bu sonuçlar hıyarlar arasındaki genetik varyasyonun oldukça az olduğunu göstermekte ve farklılık bulma ihtimalini azaltmaktadır.

Çalışmada Kök-ur nematodlarına karşı dayanıklılığı kontrol eden *mj* genini taşıyan *C. sativus* var. *hardwickii*'nin R Alef LJ 90430 varyetesinin farklı özelliklere sahip *C. sativus* var. *sativus* melezlenmesi sonucu geliştirilen Manteo (NC–44), Shelby (NC–45) ve Lucia (NC–46) adları taşıyan RI hatlar kullanılmıştır. Hıyar hat ve çeşitleri arasında genetik varyasyonun oldukça düşük olması, RAPD primerleriyle ebeveynler arasında farklılık bulunamamasında etkili olabileceği düşünülmektedir. Moury ve ark (2000), biberde TSWV karşı markır belirlemek için 250 RAPD primeri kullanmasına rağmen gene bağlı yalnızca 4 markır (3 tane coupling, 1 tane repulsion) belirlemişlerdir. Pierra ve ark (1997), biberde *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*'ya karşı dayanıklılığı kontrol eden Bs3 genine bağlı markır bulmak için 750 RAPD primeri; Djian-Caporalino ve ark (1997), *Meloidogyne* spp karşı dayanıklılığı sağlayan Me3 genine bağlı moleküler markır bulmak için ise 800 RAPD markeri kullanmışlardır. İki çalışmada da belirtilen genler için herhangi bir markır bulunamamıştır. Moury ve ark (2000), Bs3 ve Me3 bölgelerinin tür içi orijinli olabileceğini, Tsw bölgesinin ise türler arası orijinli olabileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada kullandığımız dayanıklılık kaynaklarının farklı hıyar türleri olmayıp aynı türün farklı varyetesi olmaları genetik kaynağın tür içi orijinli olduğunu göstermektedir ki, bunun da polimorfizm bulamamada bir diğer önemli neden olduğu düşünülmektedir. Tulu ve ark (2003), mercimekte antraknoz (*Colletotrichum truncatum*)'a karşı moleküler markır oluşturmak için 700 RAPD kullanmışlar ve ilgili gene bağlı sadece 2 RAPD markırı belirlemişlerdir. Bu çalışmada ise 37 tane RAPD primeri kullanıldığı dikkate alındığında, diğer araştırmalarda kullanılanlara göre oldukça az olduğu görülmekte ve polimorfizmin bulamamızda etkili olduğu düşünülmektedir. Bu veriler ışığında; ebeveynler arasında farklılığı belirlemek için

üç farklı yaklaşım üzerine yoğunlaşılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Bunlardan ilki kullanılan RAPD primer sayısının artırılması, ikinci olarak hıyar bağlantı (linkage) grubunda yeri bilinen markırların kullanılması, üçüncü olarak ise genomda daha fazla lokus tarayan markır sisteminin kullanılmasıdır. Hıyarda genetik varyasyonun çok düşük ve RAPD markırlarında tekrarlanabilirliği zor olduğu için primer sayısı artırılarak çalışma yapılmamıştır. Hıyarda daha fazla lokus tarayan markır sistemleri üzerinde odaklanarak ebeveynler arasında polimorfizm araştırmasına devam edilmiştir.

4.7. SCAR Moleküler Markır Bulguları

Bu çalışmada 14 SCAR primeri kullanılmış olup bunlardan 7 tanesinde PCR ürünü elde edilirken 7 tanesinde PCR ürünü elde edilememiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Çalışmada kullanılan SCAR primerleri ve PCR sonuçları

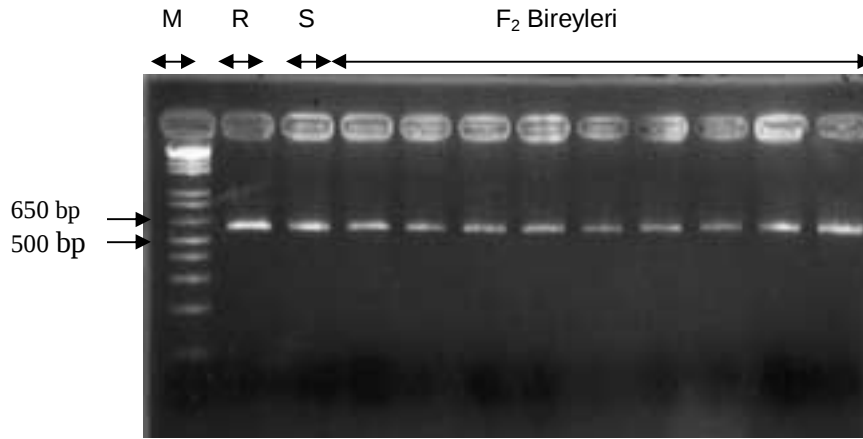
Primer Adı	PCR	Farklılık	Primer Adı	PCR	Farklılık
SCBC469	+	x	SCL18	+	x
SCL19	-	x	SCU15	-	x
SCK7	+	x	SCAN5	+	x
SCAA9	-	x	SCBC519	-	x
SCAO7	-	x	SCAK5	+	x
SCAI4	+	x	SCK15	-	x
SCBC403	-	x	SCA012	+	x

+ : PCR çalıştı

- : PCR çalışmadı

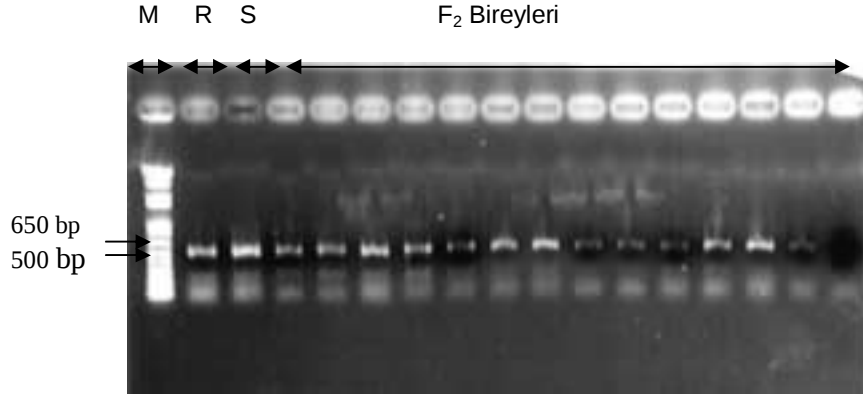
x : Polimorfizm yok

SCAN5 SCAR primeriyle yapılan PCR sonuçları Şekil 4.7’de görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi ebeveynler ve F₂ bireylerinde yaklaşık 650 bp uzunluğunda tek DNA bandı elde edilmiş, ancak ebeveynler arasında polimorfizm belirlenememiştir.



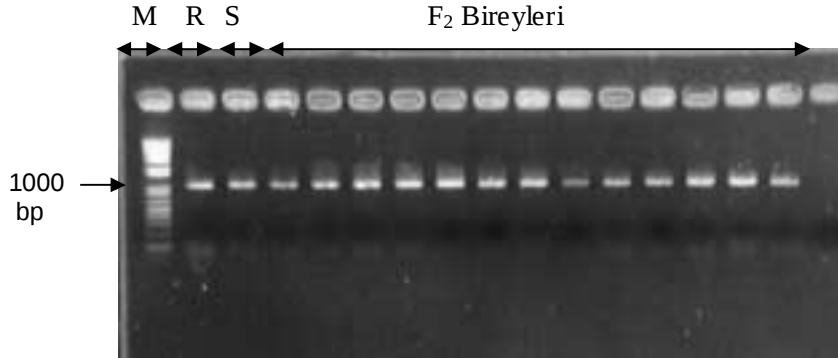
Şekil 4.7. SCAN5 SCAR primeriyle elde edilen PCR ürünleri
M: Markır, R: Dayanıklı ebeveyn, S: Duyarlı ebeveyn

SCL18 SCAR primeriyle yapılan PCR sonucu yaklaşık 500 bp uzunluğunda DNA bandı elde edilmiş fakat ebeveynler ve F₂ bireylerinde polimorfizm belirlenememiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. SCL18 SCAR primeriyle elde edilen PCR ürünleri
M: Markır, R: Dayanıklı ebeveyn, S: Duyarlı ebeveyn

SCAI14 SCAR primeriyle yapılan PCR sonuçlarına göre ebeveynler ve F₂ bireylerinde yaklaşık 1000 bp uzunluğunda tek DNA bandı elde edilmiş fakat ebeveynler arasında polimorfizm belirlenememiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. SCA14 SCAR primeriyle elde edilen PCR ürünleri
M: Markır, R: Dayanıklı ebeveyn, S: Duyarlı ebeveyn

4.8. SCAR Moleküler Markır Tartışma

SCAR markırları, RAPD ve AFLP markerleri sonucu elde edilen dizilimlerden yararlanılarak oluşturulmaktadır (Paran ve Michelmore, 1993; Von Malek ve ark, 2000; Sardesai ve ark., 2002; Agrama ve ark., 2002).

RAPD markırlarıyla markır yardımcı seleksiyon (MAS) devamlı mümkün değildir. Çünkü bir populasyon için dizayn edilen RAPD markırları diğer populasyonlar için devamlı polimorfik olamamakta veya kimi durumda güvenilirliği zayıf olmaktadır. RAPD markırları, bir RFLP probuna ya da SCAR markırına çevrilerek bu problemler aşılmaktadır (Paran ve Michelmore, 1993). SCAR markır sistemi, ilk kez marulda külleme hastalığına karşı moleküler marker oluşturmada kullanılmıştır (Paran ve Michelmore, 1993). Bu çalışmada gene bağlı olan RAPD bandları jelden kesildikten sonra klonlanmış ve sekans edilmiştir. Elde edilen diziden faydalanılarak yeni primerler (18–23 bp) dizayn edilmiştir (Paran ve Michelmore, 1993). SCAR primerleri, RAPD primerlerine göre baz dizilimleri fazla olduğu için daha spesifik olmakta, RAPD'den kaynaklanan problemler en aza inmekte ayrıca spesifik tek bant üretmektedir (Horejsi ve ark., 1999). RAPD markırlarının SCAR'a dönüştürülmesi markırın güvenilirliğini artırmakla birlikte co-dominant özellikte gösterebilmektedir (Paran ve Michelmore, 1993).

Bu araştırmada kullanılan SCAR primerleri, *C. sativus* var. *sativus* çeşitlerinin melezlenmesi sonucu oluşturulan haritalama populasyonunda bağlantı

grubunda yeri bilinen ve polimorfizm veren primerler seçilmiştir. Her bağlantı grubunda en az bir SCAR markırı seçilmiş ve bunlarla ebeveynler ve F₂ bireylerinde PCR yapılmıştır. PCR ürünlerinin öncelikle ebeveynler arasında farklılık verip/vermediğı araştırılmıştır. Seçilen 14 adet SCAR primerinden 7'sinde PCR ürünü elde edilmiş, fakat hiçbirisi ebeveynler arasında polimorfizm vermemiştir. 7 tane SCAR primerinde ise PCR ürünü elde edilememiştir. Farklı çalışmalarda orijinal RAPD markırlarında gözlenen farklılığın bazı durumlarda yeni oluşturulan SCAR'da görülmediğı bildirilmiştir (Paran ve Michelmore, 1993; Ohmori ve ark., 1994; Horejsi ve ark., 1999). Bu durum RAPD markırlarının SCAR'a dönüştürülmesi sırasında primer bağlanma bölgesindeki yer (site) mutasyonunun sebep olabileceğı düşünülmüştür (Horejsi ve ark. 1999). Konieczny ve Ausubel (1993), RAPD'de gözlenen farklılığı yeniden elde etmek için SCAR bandını kesim enzimiyle kesilerek CAPS'a çevrilebilmektedir. Williams ve ark (1994), domateste kök-ur nematodlarına karşı dayanıklılığı kontrol eden *Mi* genine bağı RAPD markırı SCAR'a dönüştürmüşlerdir. SCAR primeri hem dayanıklı hem de duyarlı bireylerde aynı bandı vermiştir. Dayanıklı ve duyarlı bireyler arasındaki farklılık TaqI kesim enzimiyle kesilerek belirlenebilmiştir. Bu markır codominat özellik taşıdığı için domateste kök-ur nematodlarına karşı dayanıklılık ıslahında rutin şekilde kullanılmaktadır.

RAPD markırlarının SCAR'a dönüştürülmesi ileri bir teknik adım olarak görülmekle birlikte (Paran ve Michelmore, 1993), bu dönüştürmede kimi zaman problemlerle karşılaşılmakta ve istenilen SCAR primerleri elde edilememektedir (Horejsi ve ark., 1999). Bu çalışmada kullanılan SCAR primerlerin bazılarının çalışmamasının ve çalışanlarının ise ebeveynler arasında farklılık vermemesinin nedenlerinin bir diğeri de üzerinde çalışılan çeşitlere özgü spesifik primer olmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bir diğeri önemli noktada, kullanılan ebeveynler birbirlerine çok yakın oldukları için SCAR markırlarıyla polimorfizm elde edilemediğı düşüncesidir. SCAR markırlarının ebeveynler arasında uzunluk polimorfizmi vermemesine rağmen, dizilimler arasında farklılıklar verebileceğı düşünülmüştür. Bunu belirlemek için; birinci olarak SCAR ürünleri klonlanıp sekans edilerek dizilim farklılığı olup/olmadığına bakılmalı ya da 4–6 baz tanıma bölgesine

sahip farklı kesim enzimleri ile kesilerek ebeveynler arasındaki polimorfizm araştırılmalıdır. Şayet RAPD markırlarıyla ebeveynler arasında polimorfizm belirlenebilseydi; bu RAPD primerlerleri SCAR'a çevrilerek bahsedilen iki yöntem üzerinde de çalışmalar hızlandırılacaktı. Fakat birbirlerine çok yakın hıyar çeşitlerinin haritalama popülasyonu sonucu elde edilen SCAR olmaları nedeniyle, bahsedilen çalışmalar üzerine yoğunlaşılmamış, buna karşılık genom hakkında daha çok bilgi veren AFLP, SRAP ve co-dominant özellik taşıyan SSR markırları üzerine odaklanılmıştır.

4.9. AFLP Moleküler Markır Bulguları

4.9.1. DNA'ların Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi

Genomik DNA, iki farklı kesim (restriksiyon) enzimi ile kesilmektedir. Bu enzimlerden birisi DNA'yı sık kesme (4 bp kesici), diğeri ise seyrek kesme (6 bp kesici) özelliklerine sahiptirler. Sık kesim sonucu küçük DNA bantları oluşur ve bunlar poliakrilamid jelde optimum oranda ayrılırlar. En çok kullanılan enzim çiftleri EcoRI-MseI primerler olmakla birlikte başka enzim kombinasyonları da kullanılmaktadır. EcoRI enzimi; 6 bp tanıma bölgesine (5...GAATTC...3) sahip olup DNA'yı yaklaşık olarak her 2-2.5 kb, MseI enzimi ise 4 bp tanıma bölgesine (5....TTAA...3) sahip olup DNA'yı her 300-400 bp da kesmektedirler (Vos ve ark, 1995). Genomik DNA EcoRI ve MseI enzimleriyle kesilince genomda üç farklı DNA fragmenti (EcoRI-EcoRI, MseI-MseI, MseI-EcoRI) kombinasyonu oluşmaktadır. MseI-MseI fragmentleri sık kesim sonucu oluşur ki bunlar küçük DNA fragmentleri olup jelde en çok bunlar bulunmaktadır. EcoRI-EcoRI fragmentleri seyrek kesim sonucu oluşurlar. Bir diğeri fragmentler ise MseI ve EcoRI enzimlerinin kesilmesi sonucu oluşurlar ki bunlar jelde MseI-MseI fragmentlerinden sonra en çok bulunanlardır (Vos ve ark., 1995).

DNA örneklerinin enzimle kesilmesi, AFLP çalışmalarını etkileyen en önemli etken olup çalışmaların temelini oluşturmaktadır. Her bir DNA örneğinin miktarı birbirlerine eşit olmalıdır. Miktarların farklı olması kesimde farklılıklara neden olarak AFLP görüntüsünde yanıltıcı bantlar vermektedir. Şöyle ki, DNA

konsantrasyonu düşük olan bir örneğin ilgili bandı gözükmeyebilirken, konsantrasyonu yüksek olan bir bireyin ilgili bandı gözükabilir ki bu da çalışmada yanlış polimorfizm olarak karşımıza çıkabilmektedir. DNA konsantrasyonu yoğun olan bireylerde enzimle kesim sırasında kısmi kesimler olacağı için bu da bize farklı polimorfizmler olarak görüneceğinden bizi yanıltabilecektir. Bütün bu olasılıklar dikkate alınarak her bir örnekten 250 ng DNA kullanılarak 37 °C'deki su banyosunda 3 saat bekletilerek kesim işlemi gerçekleştirilmiştir.

4.9.2. Kesilen DNA'ların Adaptörlerle Birleştirilmesi

Genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucu oluşan bantlar kendilerine özgü adaptörlerle birleştirilmiştir. AFLP adaptörleri çift iplikçikli yapıya sahip olup, Core Dizisi (CD) ve Enzim Spesifik Dizisi (ESB) olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadırlar. Core Dizisi, kendi primerinin Core Dizisi ile aynı yapıya sahip olup, ESB bölgesi ise değişkenlik göstermektedir.

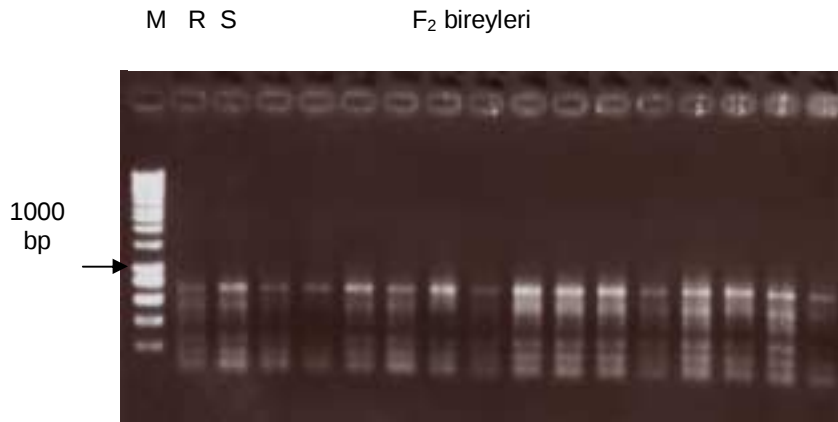
Restriksiyon enzimleriyle kesilen genomik DNA'lar, çift iplikçik yapıya sahip olan adaptörler birbirleriyle eşleşen nükleotid sıralarına sahip olduğundan DNA ligaz enzimi ve ATP yardımıyla kolayca birleşebilmektedir. Uygun birleşme olması için 20 °C'deki sirkülasyonlu su banyosunda 12 saat bekletilerek birleştirme gerçekleştirilmiştir.

4.9.3. Ön PCR

Adaptörlerle birleştirilen DNA bantları bu adaptörlere uygun AFLP primerleriyle PCR yapılmaktadır. AFLP primerleri; PCR çalışmalarında kullanılan normal primerlerden oldukça farklı bir yapıya sahip olup; Core Dizisi (CD), Enzim Spesifik Dizisi (ESD) ve Selektif Uzama Dizisi (SUD) olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır (Vos ve ark, 1995). CD ve ESD devamlı sabit olmasının yanında SUD değişkenlik göstermekte ve bu kısma istenilen baz eklenerek seçicilik artırılabilir. EcoRI ve MseI primerlerinin yapısı aşağıda gösterilmiştir:

	CD	ESD	SUD
EcoRI	5'-GACTGCGTACC	AATTC	NNN-3'
MseI	5'-GATGAGTCCTGAG	TAA	NNN-3'

Büyük genomlu organizmalarda ön PCR, tercih edilen bir yöntemdir. Hıyar da büyük genoma sahip organizma olduğu için ön PCR yapılmıştır. PCR reaksiyonunu normal PCR malzemelerini içermekle birlikte, primerlere birer baz (MseI+N, EcoRI+N) ilave edilerek PCR yapılması ve PCR döngüsünün (20 döngü) kısa tutulması ana farklılıklardır. Çalışmamızda EcoRI primeri için T ve A nükleotidleri, MseI primeri için ise C nükleotidi seçici baz olarak kullanılmıştır. Adaptörle ligasyon işlemi sonucu oluşan ürünler 1/10 oranında seyreltikten sonra bunlardan 2,5 µl karışım alınarak PCR gerçekleştirilmiştir. Bu bahsedilen miktar ile çok sayıda DNA çoğaltılmış ve çalışma için yeterli miktarda DNA elde edildiği görülmüştür (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Ön PCR ürünleri, M: Markır, R: Dayanıklı ebeveyn, S: Duyarlı ebeveyn

4.9.4. Primerlerin İşaretlenmesi

Poliakrilamid jelde DNA'ları gözlemlemek ve değerlendirmek için EcoRI veya MseI primerlerinden biri işaretlenmektedir. Primerin 5' ucuna P³² veya P³³ kullanılarak T4 polinükleotid kinase enzimi yardımı ile P (fosfat) eklenmektedir. P³² ve P³³ yanında fluorescent ve silver staining gibi ekipmanlarla da işaretleme

yapılabilmektedir (Vos ve ark, 1995; Hartl ve Seefelder, 1998; Ridout ve Donini 1999). AFLP çalışmada EcoRI primerleri P³³ kullanılarak işaretlenmiştir.

4.9.5. Seçici PCR

Seçici PCR'da, primerlerin 3' ucuna iki, üç veya dört baz ilave edilerek ve primerin biri işaretlenerek touchdown PCR yapılmaktadır. Primerlerin bağlanma sıcaklıkları ilk önce 65 °C'den başlar her döngüde 1 derece azalarak (10 döngü) 56 °C ye kadar düşmesi sağlanır ve 25 döngü daha yapılarak PCR işlemi gerçekleştirilir. Başlangıçta primer bağlanma sıcaklığı yüksek tutularak yanlış eşleşmelerin engellenmesi sağlanmaktadır. Primerlere eklenen baz sayısı arttıkça özelleşme artmaktadır. Küçük genomlarda (10^6-10^7) bir ya da iki seçici nükleotidli primerleri polimorfizm bulmak için yeterli olduğu, büyük (karmaşık) genomlarda (10^8-10^9) 3 seçici nükleotidli primerler daha iyi polimorfizm verdiği bildirilmiştir (Vos ve ark., 1995).

Ön PCR ürünleri 1/50 oranında seyreltikten sonra seçici PCR yapılmıştır. Çalışmada her AFLP primer kombinasyonu için ortalama 45 fragment elde edilmiştir. Bu da AFLP çalışmaları için normal kabul edilmektedir. EcoRI ve MseI primerlerine 3 seçici baz ilavesi çalışmamız için uygun bulunmuştur. Ayrıca EcoRI primerlerine 3, MseI primerlerine 4 seçici baz eklenerek seçici PCR yapılmış ve bantların sayısının azaldığı görülmüştür. Bazı primer kombinasyonlarının ise iyi çalışmadığı gözlemlenmiştir.

4.9.6. Poliakrilamid Jel Analizi

Seçici PCR ürünleri (10 µl), üzerine 10 µl formamide dye ilave edilmiş ve 94 °C' 5 dakika tutularak DNA'ların ayrılması sağlandıktan sonra örnekler hemen buz üzerine alınmıştır. Her bir örnekten 5 µl alınarak jel kutucuklarına yüklenmiştir. Jel, 65 Watta 2.5 saat yürütülmüş ve jel, jel kurutucuda 85 °C'de 2 saat kurutulduktan sonra üzerine X ray film (Kodak) koyularak oda sıcaklığında 3 gün bekletilmiştir. Film, geliştirilmiş ve elde edilen DNA bantları değerlendirilmiştir.

4.9.7. Bulked Segregant Analysis

Bulked segregant analizi, herhangi bir gen bölgesine bağlı markır belirlemede hızlı, basit ve güvenilir bir yöntemdir (Michelmore ve ark., 1991). Yöntemin uygulamasındaki amaç, arzu edilen gen veya karakter için bir populasyonun olmasıdır. Burada populasyon arzu edilen karakteri taşıyan ve taşımayanların melezlenmesiyle elde edilmektedir. Populasyonu oluşturan bireyler istenilen karakteri içerenler ve içermeyenler olarak belirlendikten sonra, DNA'ları iki farklı havuz olarak oluşturulmaktadır. Böylece arzu edilen karakter açısından aynı ama diğer bölgeler bakımından tamamen tesadüfi olan bir materyal elde edilmiş olmaktadır (Michelmore ve ark., 1991). Havuzlar arasında farklılık gösteren bant (markır) genetiksel olarak istenilen özelliğe bağlı olabilmektedir. BSA metodu; RAPD, AFLP ve SSR markırları ile birlikte bitkilerde agronomik öneme sahip genlerle ilgili markır oluşturmada yoğun şekilde kullanılmaktadır (Lee, 1995; Young, 1999).

Ebeveynlerin melezlemesi sonucu oluşturulan F₂ bireyleri *M. javanica* ırk 1 ile testlenerek dayanıklılık ve duyarlılıkları belirlenmiştir. Böylece dayanıklı ve duyarlı bireyleri içeren iki farklı havuz oluşturulmuştur. Burada 10 tane dayanıklı ve 10 tane en duyarlı bitkilerden ayrı ayrı DNA izole edilmiştir. Bu aşamadan sonra DNA'lar iki farklı şekilde havuz yapılmıştır. Birinci olarak genomik DNA'lar birleştirilmiştir ki en çok bu yöntem tercih edilmektedir (Williams ve ark, 2002; Quedraogo ve ark., 2001; Tullu ve ark., 2003). İkinci olarak ise ön PCR aşamasından sonra DNA havuzları oluşturulmuştur. Yapılan çalışmada her iki yöntem açısından farklılık gözlemlenmemiştir. BSA metodunda, her bir havuz 5–20 bireyden oluşturulmaktadır (Michelmore ve ark., 1991; Williamsve ark., 2002; Quedraogo ve ark, 2001; Tullu ve ark., 2003). Bu araştırmalar dikkate alınarak çalışmamızda her bir havuz için 10 bitki kullanılmıştır.

Bulked segregant analizi, moleküler markırla ebeveynleri ve havuzları hızlı ve kolay şekilde tarayarak F₂ populasyonunda amacımıza uygun şekilde ulaşmamızı sağlamıştır. Ayrıca bireysel DNA'ların ayrı ayrı kullanılması yerine havuz DNA'ların kullanılması, analiz sayısını azaltarak çalışmayı hızlandırmış ve 20 birey

yerine 2 havuzun jele yüklenmesi araştırmanın daha kolay yürütülmesine ve sonuçların daha hızlı değerlendirilmesine imkân vermiştir.

4.9.8. Gene (*mj*) Bağlı Olduğu Düşünülen AFLP Markırlarının Belirlenmesi

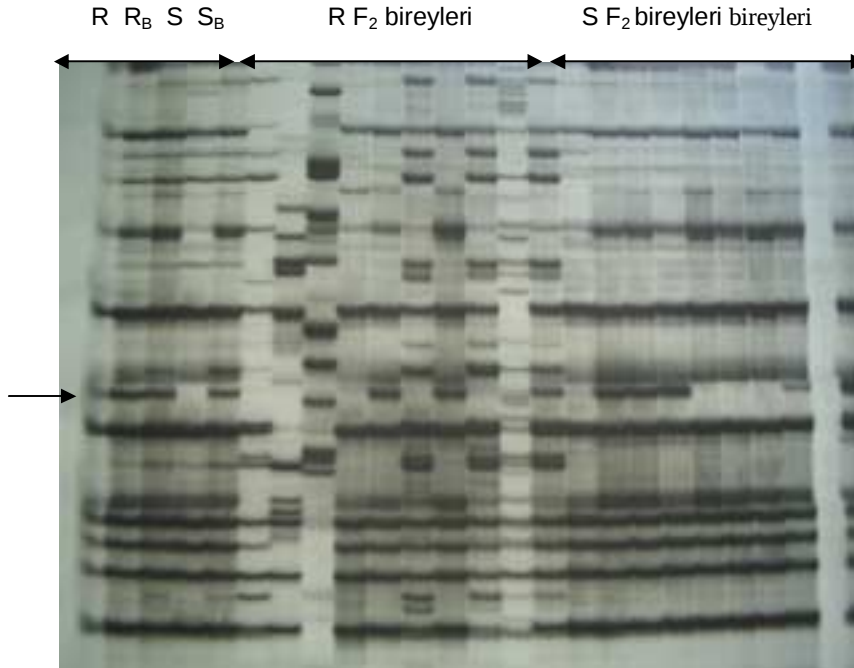
Bu çalışmada 100 tane EcoRI primer-MseI primer kombinasyonu kullanılmış olup bunların 42 tanesi ebeveynler (R ve S) ve havuzlar (R_B ve S_B) birlikte, 58 tanesi ise yalnızca dayanıklı ve duyarlı ebeveynlerde taranmıştır. 8 tane EcoRI primer-MseI primer kombinasyonu (E-TTC/M-CTT, E-TAG/M-CGT, E-ACG/M-CTG, E-AAC/M-CGT, E-AAC/M-CTC, E-AAC/M-CAA, E-ACT/M-CCT ve E-ACT/M-CAG) herhangi bir PCR ürünü elde edilmemiştir. Primer kombinasyonlarının çalışmaması konusunda; primerlerin bağlanmamasından, PCR çalışması aşamasındaki pipet hatalarından veya PCR kimyasallarının biri veya bir kaçının çalışmamasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Bununla beraber bu primerlerle birlikte yapılan diğer primer kombinasyonlarıyla PCR sonuç verdiği için bu primerlerin tekrar çalışmama nedeni araştırılmamış yeni primer kombinasyonları kullanılmıştır.

PCR ürünü veren 92 tane EcoRI primer-MseI primer kombinasyonlarıyla hıyar genomunda toplam 11150 genetik lokus analiz edilmiş olup her bir primer kombinasyonunun ortalama 45 tane DNA bandı verdiği gözlemlenmiştir. Araştırmada kullanılan 92 tane EcoRI primer-MseI primer kombinasyonundan sadece 3'ü dayanıklı ve duyarlı ebeveynler arasında polimorfizm vermiştir (Şekil 4.11-13).

BSA yöntemine göre; bir AFLP bandının değerlendirmeye alınabilmesi için oluşturulan havuzların birinde olmalı buna karşılık diğerinde ise olmamalıdır. Eğer dayanıklı havuzda varsa, dayanıklı havuzu oluşturan F₂ bireylerinin hepsinde olmalı, buna karşılık duyarlı havuzda ve duyarlı havuzu oluşturan F₂ bireylerinde olmamalıdır. Ya da polimorfik bant duyarlı havuzda varsa, bu bant duyarlı havuzları oluşturan F₂ bireylerinin hepsinde olmalı, buna karşın dayanıklı ebeveynde ve dayanıklı havuzu oluşturan F₂ bireylerinin hiç birisinde olmamalıdır. Bu bilgiler altında bir bandın klonlama çalışmasına alınıp/alınmamasına karar verilmektedir. Bir polimorfik bandın klonlamaya alınabilmesi için bir diğer yaklaşımda o bandın sahip

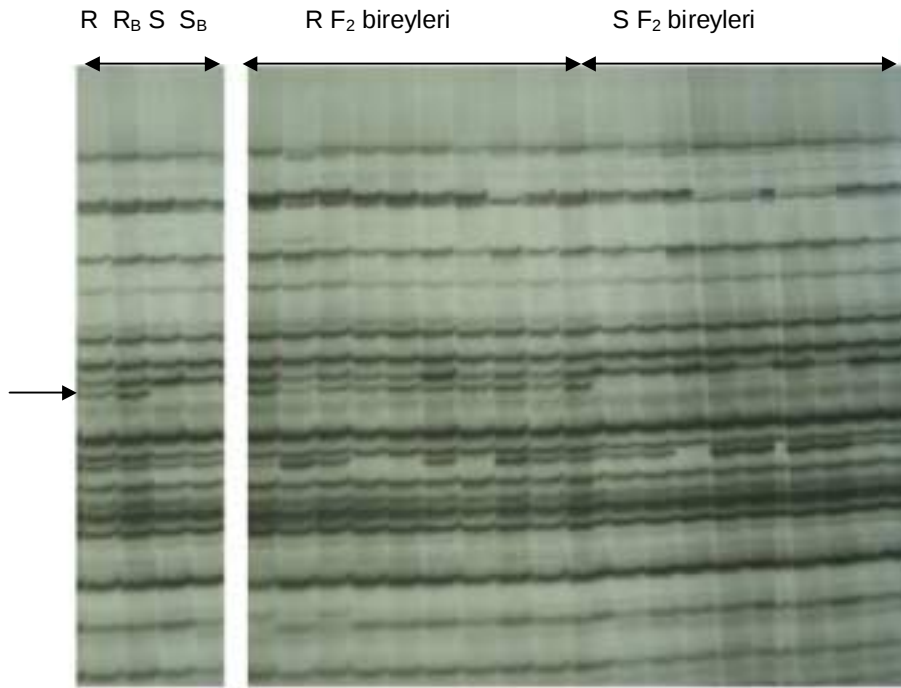
olduğu uzunluğudur. Bandın uzun olması dayanıklı ve duyarlı ebeveynler arasındaki dizilim farklılığının olmasını artırmaktadır. Polimorfik bandın uzunluğu arttıkça polimorfizm oranı da artmaktadır. Çünkü bantlar arasındaki uzunluk farklılığının olmasında dizilim farklılığından yararlanılarak spesifik primerler oluşturulmakta veya CAPS markırlarına çevirmek mümkün olmaktadır.

E-TCC/M-CTT primer kombinasyonları sonucu elde edilen AFLP bantları incelendiğinde dayanıklı ebeveynde görülen bantların duyarlı ebeveynde bulunmadığı görülmektedir (Şekil 4.11). Duyarlı havuzdaki bant yoğunluğu dayanıklı havuzdan daha az olduğu için her iki havuzu oluşturan F_2 bireyleri bu primer kombinasyonu ile taranmıştır. Burada görüldüğü gibi dayanıklı bireylerde görülen bant duyarlı F_2 bireylerin yarısında (5/10) görülmüştür. Ayrıca dayanıklı F_2 bireylerinin hepsinde de bu banda rastlanamamıştır. E-TCC/M-CTT primer kombinasyonları belirlenen bu polimorfik AFLP bandının uzunluğunun küçük (yaklaşık 50 bp uzunluğunda) olması ve BSA yöntemine göre uygun olmaması nedeniyle jelden kesilmemiş ve klonlama yapılmamıştır.



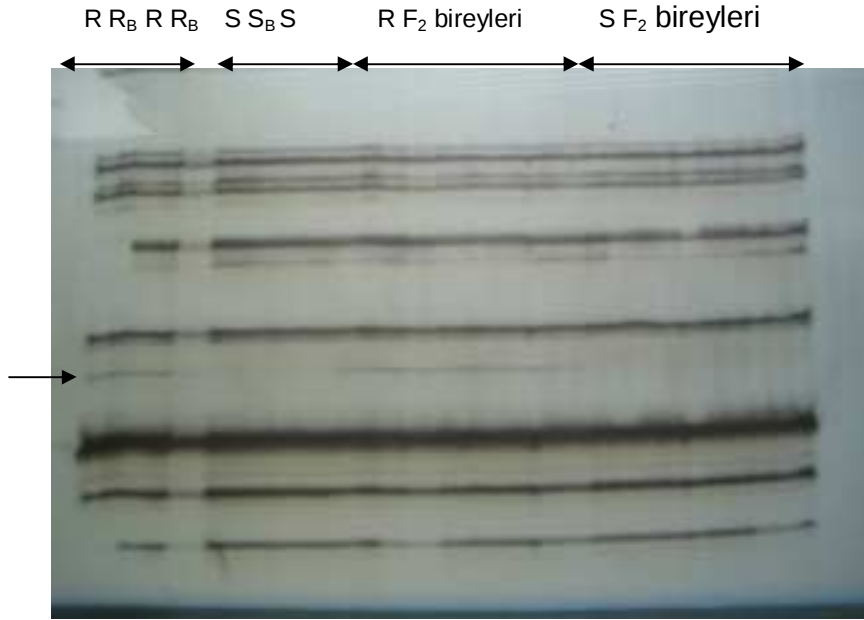
Şekil 4.11. E-TCC/M-CTT primer kombinasyonlarıyla elde edilen AFLP bantları
 R: Dayanıklı ebeveyn (Lucia), S: Duyarlı ebeveyn (Batem1)
 R_B: Dayanıklı havuz, S_B: Duyarlı havuz

E-ATT/M-CAA AFLP primer kombinasyonlarıyla dayanıklı ve duyarlı havuzlar arasındaki farklılık görülmektedir (Şekil 4.12). DNA bandı dayanıklı ebeveyn ile dayanıklı havuzda bulunmakta, buna karşılık duyarlı ebeveyn ile duyarlı havuzda görülmemektedir. Bu farklılık saptandığı için AFLP primer kombinasyonları ile dayanıklı (10 tane F_2) ve duyarlı (10 tane F_2) F_2 bireylerinde tarama yapılmıştır. Bu polimorfizm dayanıklı havuzu oluşturan 10 dayanıklı F_2 bireylerinin hepsinde görülmesine karşın, duyarlı havuzu oluşturan 10 duyarlı F_2 bireyinde gözlemlenememiştir (Şekil 4.12). Yaklaşık 200 bp uzunluğundaki bu AFLP bandının, *mj* geni için potansiyel moleküler markır olduğu düşünülmüştür. Bu bulgularla dayanıklı ve duyarlı ebeveynlerin dizilimleri arasında polimorfizm olma ihtimalini güçlendirdiği düşünülmüş ve dayanıklı ve duyarlı havuzları oluşturan F_2 bireylerinin tümü yeni bir poliakrilamid jelde yürütülmüş ve daha sonra jelden DNA bandı klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere kesilmiştir.



Şekil 4.12. E-ATT/M-CAA primer kombinasyonlarıyla elde edilen AFLP bantları
R: Dayanıklı ebeveyn (Lucia), S: Duyarlı ebeveyn (Batem1)
R_B: Dayanıklı havuz, S_B: Duyarlı havuz

E-AAC/M-CTG AFLP primer kombinasyonlarıyla dayanıklı ve duyarlı havuzlar arasındaki farklılık Şekil 4.13'de görülmektedir. DNA bandı dayanıklı ebeveyn ile dayanıklı havuzda bulunmakta, buna karşın duyarlı ebeveyn ile duyarlı havuzda görülmemektedir. Elde edilen bu farklılık aynı primer kombinasyonu ile dayanıklı (10 tane F_2) ve duyarlı (10 tane F_2) F_2 bireylerinde incelemeye alınmıştır. Bu DNA bandı, dayanıklı havuzu oluşturan 10 dayanıklı F_2 bireyinin hepsinde gözlemlenmiş, buna karşılık duyarlı havuzu oluşturan 10 duyarlı F_2 bireyinde ise gözlemlenememiştir (Şekil 4.13). Yaklaşık 100 bp uzunluğundaki bu bandın, *mj* geni için potansiyel moleküler markır olduğu düşünülmüştür. Bu durum dayanıklı ve duyarlı ebeveynlerin dizilimleri arasında polimorfizm olasılığının düşük olması göz önüne alınmış olsa da dayanıklı ve duyarlı havuzları oluşturan F_2 bireylerinin tümü yeni bir poliakrilamid jelde yürütülmüş ve daha sonra bu polimorfik bant jelden kesilmiştir.

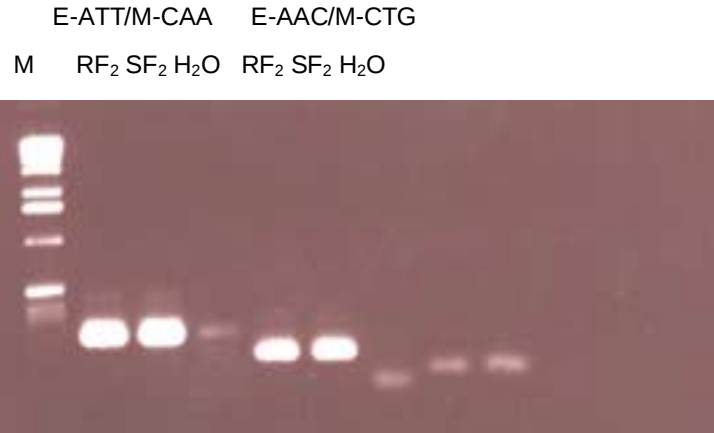


Şekil 4.13. E-AAC/M-CTG primer kombinasyonlarıyla elde edilen AFLP bantları
R: Dayanıklı ebeveyn (Lucia), S: Duyarlı ebeveyn (Batem1)
R_B: Dayanıklı havuz, S_B: Duyarlı havuz

4.9.9. Markırların Klonlanması, Sekanslarının Yapılması ve Primerlerin Oluşturulması

E-ATT/M-CAA ve E-AAC/M-CTG AFLP primer kombinasyonları dayanıklı ebeveynde ve dayanıklı F₂ bireylerinde gözlemlenen bantlar ile bunlara karşı gelen bantlar (duyarlı ebeveynde ve duyarlı F₂ bireylerinde bulunmayan bantlar), Sambrook ve ark (1989)'nın bildirdikleri Crush ve Soak metoduna göre poliakrilamid jelden kesilerek DNA'ları elde edilmiştir. DNA'lar kullanılarak AFLP primerleriyle seçici PCR yapılmıştır. PCR ürünleri % 2,5'lik agaroz jelde 25 volt da 1 saat yürütüldükten sonra klonlama yapmak için jelden kesilmiştir (Şekil 4.14).

E-ATT/M-CAA ve E-AAC/M-CTG AFLP primer kombinasyonlarıyla elde edilen PCR ürünleri Şekil 4.14'de görülmektedir. E-ATT/M-CAA primer kombinasyonu ile yaklaşık 200 bp, E-AAC/M-CTG primer kombinasyonu ile ise yaklaşık 100 bp DNA bandı belirlenmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi seçici PCR ürünleri hem dayanıklı ebeveynde hem de duyarlı ebeveynde gözlemlenmiştir. Bu AFLP sisteminin doğasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.14. Poliakrilamid jelden elde edilen DNA'ların seçici PCR ürünleri
M: Markır, RF₂ : Dayanıklı F₂ bireyleri, SF₂ : Duyarlı F₂ bireyleri

Bu bantlar, agaroz jelden kesilmiş ve Qiagen kiti kullanılarak DNA'lar elde edilmiştir. Bu DNA'lar, TOPO TA cloning kit (pCR 4-TOPO, Invitrogen) kullanılarak klonlanmış ve klonlanan kolonilerden Qiagen kiti kullanılarak plasmid

izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Her DNA bandı için 20 plasmidden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Şöyle ki, E-ATT/M-CAA AFLP primer kombinasyonu için dayanıklı ebeveynlerden 20, duyarlı ebeveynlerden 20 olmak üzere toplam 40 tane klonlanan plasmid izolasyonu yapılmıştır. E-AAC/M-CTG AFLP primer kombinasyonu için dayanıklı ebeveynlerden 20, duyarlı ebeveynlerden 20 olmak üzere toplam 40 tane klonlanan plasmid izolasyonu yapılmıştır. Sonuçta toplam 80 tane plasmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. AFLP çalışmalarında genel olarak 4–10 tane klonlanan plasmid izole edilerek sekans yapılmıştır (Agrama ve ark, 2002). Burada örnek sayısını artırarak doğru AFLP bandının klonlamış olduğundan emin olunmak istenmiştir.

Klonlamanın gerçekleştiğini öğrenmek için vektör haritasından yararlanarak EcoRI enzimiyle kesim yapılmış ve örnekler % 2.5’lik agarozda 25 voltta 1 saat yürütölmüş ve fotoğraflanmıştır (Şekil 4.15–18).

E-ATT/M-CAA primeriyle dayanıklı bireylerde elde edilen PCR ürünlerinin klonlanması Şekil 4.15’de görölmektedir. Şekilde göröldüğü gibi örneklerin tamamı EcoRI enzimi ile kesilmiş ve böylece klonlanma gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.15. Klonlanan ürünlerin EcoRI enzimiyle kesimi, M: Markır

E-ATT/M-CAA primeriyle duyarlı bireylerde elde edilen PCR ürünlerinin klonlanması Şekil 4.16’da görölmektedir. Şekilde göröldüğü gibi örneklerin tamamı EcoRI enzimi ile kesilmiş ve böylece klonlanma gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.16. Klonlanan ürünlerin EcoRI enzimiyle kesimi, M: Markır

E-AAC/M-CTG primeriyle dayanıklı bireylerde elde edilen PCR ürünlerinin klonlanması Şekil 4.17’de görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi örneklerin tamamı EcoRI enzimi ile kesilmiş ve böylece klonlanma gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.17. Klonlanan ürünlerin EcoRI enzimiyle kesimi, M: Markır

E-AAC/M-CTG primeriyle duyarlı bireylerde elde edilen PCR ürünlerinin klonlanması Şekil 4.18’de görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi örneklerin tamamı EcoRI enzimi ile kesilmiş ve böylece klonlanma gerçekleştirilmiştir.



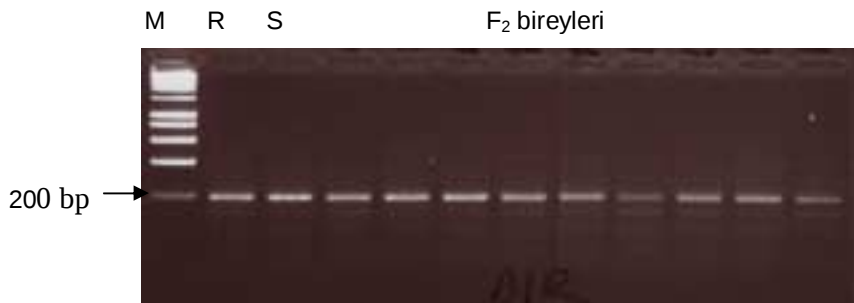
Şekil 4.18. Klonlanan ürünlerin EcoRI enzimiyle kesimi, M: Markır

Klonlanan toplam 80 tane AFLP bandı M13 universal primeri ile PCR yapıldıktan sonra sekans edilmiştir. Sekans sonuçları, Vektör NTI programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

E-ATT/M-CAA primer kombinasyonları için; klonlamaya aldığımız bantlar dayanıklı ebeveyne bağlı olduğu için dayanıklı bireylerden elde edilen 20 tane sekans sonucu karşılaştırılmış ve bunların 16 tanesinin birbirleriyle aynı dizilime sahip olduğu, geri kalan 4 tanesinin ise farklı olduğu ve birbirleriyle aynı dizilimleri taşımadığı görülmüştür. Duyarlı bireylerden elde edilen 20 sekansın ise dayanıklı bireylerden elde edilen sekanslara sahip olmadığı görülmüş ve kendi aralarında gruplanmış oldukları gözlemlenmiştir.

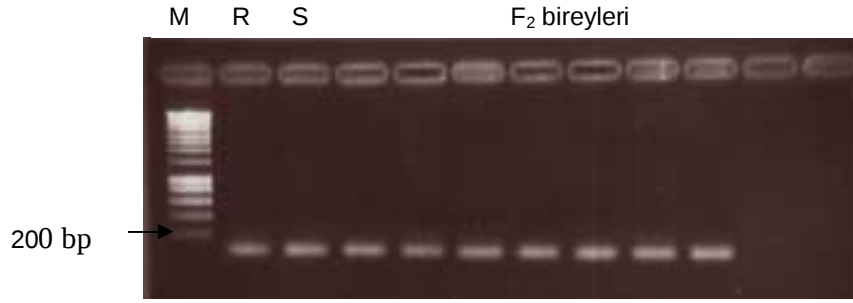
E-AAC/M-CTG primer kombinasyonlarıyla elde edilen polimorfik DNA bandı dayanıklı ebeveynde ve dayanıklı F₂ bireylerde görüldüğü için bunlardan gelen 20 sekans sonucu karşılaştırılmış ve bunların 17 tanesinin birbirleriyle aynı dizilime sahip olduğu, geri kalan 3 tanesinin ise farklı olduğu ve birbirleriyle aynı dizilimleri taşımadığı görülmüştür. Duyarlı F₂ bireylerinden elde edilen 20 sekans ise dayanıklı bireylerden elde edilen sekanslarla aynı dizilime sahip olmadığı ve kendi aralarında gruplanmış oldukları gözlemlenmiştir.

AFLP primer kombinasyonundan elde edilen dizilim sonuçları bantlarını klonlamış olma ihtimalimizi güçlendirmiş bulunmaktadır. Sonuçların güvenilirliği geliştirilen primerlerin ebeveynlerde çalışmasıyla doğrulanmaktadır. Bunun için sekans sonuçları Vektör NTI programı yardımıyla değerlendirilerek D1F, D1R, D17F ve D17R olarak adlandırılan primerler oluşturulmuştur. Geliştirilen primerler dayanıklı ve duyarlı ebeveynlerde touchdown PCR programı kullanılarak PCR yapılmış ve ebeveynler arasında uzunluk polimorfizmi olup/olmadığı araştırılmıştır.



Şekil 4.19. D1F ve D1R primerleriyle elde edilen PCR ürünleri,
R: Dayanıklı ebeveyn (Lucia), S: Duyarlı ebeveyn (Batem1)

D1F (forward) ve D1R (reverse) primerleriyle ebeveynler (dayanıklı ve duyarlı) ve F₂ bireylerinde 190 bp uzunluğunda DNA bandı elde edilmiş fakat ebeveynler arasında polimorfizm vermemiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.20. D17F ve D17R primerleriyle elde edilen PCR ürünleri
R: Dayanıklı ebeveyn (Lucia), S: Duyarlı ebeveyn (Batem1)

D17F ve D17R primerleriyle ebeveynler ve F₂ bireylerinde 70 bp DNA bandı elde edilmiş fakat ebeveynler arasında polimorfizm vermemiştir (Şekil 4.20).

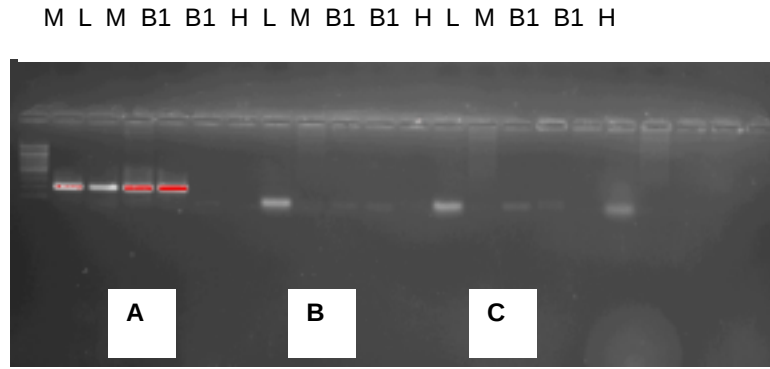
Geliştirilen primerlerle dayanıklı ve duyarlı ebeveynler arasında polimorfizm bulunamadığı için her iki ebeveyninden elde edilen PCR ürünlerinin arasında dizilim farklılığı olup/olmadığı incelenmiştir. Bunun için bu primerle elde edilen DNA bantları agaroz jelden kesilmiş ve Qiagen kiti kullanılarak DNA'lar elde edildikten sonra sekans işlemi yapılmıştır. Sekans sonuçları Vektör NTI programı kullanılarak değerlendirilmiş ve elde edilen dizilimler karşılaştırılmıştır.

E-AAC/M-CTG primeriyle elde edilen 70 bp uzunluğundaki DNA bandı dayanıklı ve duyarlı ebeveynler arasında dizilim farkı göstermediğinden PCR'a dayalı moleküler markır olarak değerlendirilememiştir.

E-ATT/M-CAA primerleriyle elde edilen 190 bp uzunluğundaki DNA bandı dayanıklı ve duyarlı ebeveynler arasında polimorfizm göstermiştir. DNA dizilimlerindeki farklılığın herhangi bir enzim kesim bölgesini içermediği görülmüştür. Şayet bu bölge herhangi bir enzimin kesim bölgesi olsaydı CAPS'a çevrileceğinden, dayanıklı ve duyarlı ebeveynler birbirlerinden kolaylıkla ayrılabilirdi. Böylece codominant CAPS markırı ile geniş popülasyondaki F₂ bireyleri taranarak bu markırın *mj* genine olan uzaklığı da ortaya konulmuş olacaktı. AFLP bandının CAPS markırına çevrilememesi bu düşünceleri gerçekleştirmeye

imkân vermemiştir. Buna karşılık dayanıklı ve duyarlı bireylerde farklılık veren bölgeye özgü geliştirilen iki reverse primer (ZRR: Dayanıklı Reverse Primer, ZSR: Duyarlı Reverse Primer) ile PCR yapılarak etkin çalışıp/çalışmadığı araştırılmıştır.

D1F-D1R, D1F-ZRR ve D1F-ZSR primer kombinasyonlarıyla PCR sonuçları Şekilde 4.21’de görülmektedir. Şekildeki A profilinde görüldüğü gibi daha önce geliştirilen D1F/D1R primerleriyle PCR ürünü elde edilmiştir. Buna karşılık yeni geliştirilen D1F/ZRR ve D1F/ZSR primerleriyle (B ve C profilleri) PCR ürünü elde edilememiştir. Burada PCR’dan bir problem kaynaklanıp/kaynaklanmadığını araştırmak için başta annealing sıcaklığı olmak üzere diğer PCR kimyasalları üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bu araştırmalar sonucu geliştirilen bu primerlerin sekans diziliminden kaynaklanan nedenlerden dolayı çalışmadığına karar verilmiştir.



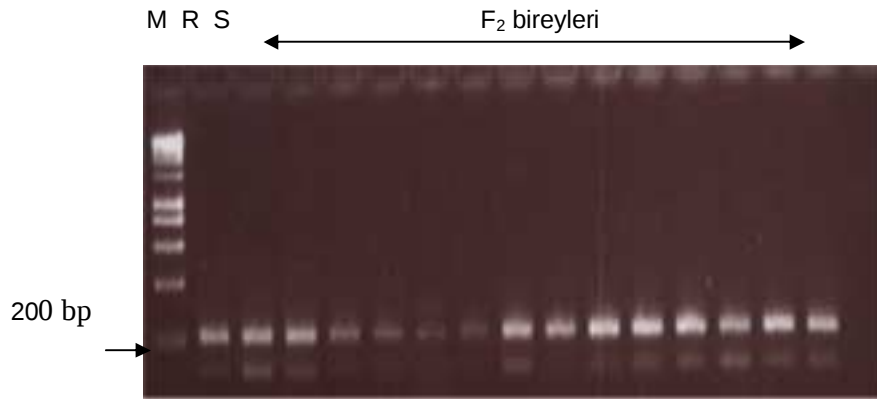
Şekil 4.21. Dizayn edilen primerlerle elde edilen PCR ürünleri
M: Markır (1 kb), L: Lucia, M: Manteo, B1: Batem1, B2: Batem2, H: Su
A Profili: D1F-D1R, B Profili: D1F-ZRR, C Profili: D1F-ZSR

D1F-D1R, D1F-ZRR ve D1F-ZSR primer kombinasyonlarıyla PCR sonuçları Şekilde 4.21’de görülmektedir. Şekildeki A profilinde görüldüğü gibi daha önce geliştirilen D1F/D1R primerleriyle PCR ürünü elde edilmiştir. Buna karşılık yeni geliştirilen D1F/ZRR ve D1F/ZSR primerleriyle (B ve C profilleri) PCR ürünü elde edilememiştir. Burada PCR’dan bir problem kaynaklanıp/kaynaklanmadığını araştırmak için başta annealing sıcaklığı olmak üzere diğer PCR kimyasalları üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bu araştırmalar sonucu geliştirilen bu primerlerin sekans diziliminden kaynaklanan nedenlerden dolayı çalışmadığına karar verilmiştir.

4.9.10. Geliştirilen ve Seçici AFLP Primerleriyle PCR

Dizayn edilen primerlerle ebeveynler arasında polimorfizm belirlenemediği için AFLP çalışmasında kullanılan ön PCR ürünleri kullanılarak polimorfizm bulmaya çalışılmıştır. Bunun için AFLP çalışmasında polimorfizm veren EcoRI ve MseI primerler kombinasyonları, geliştirilen primerlerle birlikte PCR yapılarak ebeveynlerde elde edilen PCR ürünleri karşılaştırılmıştır.

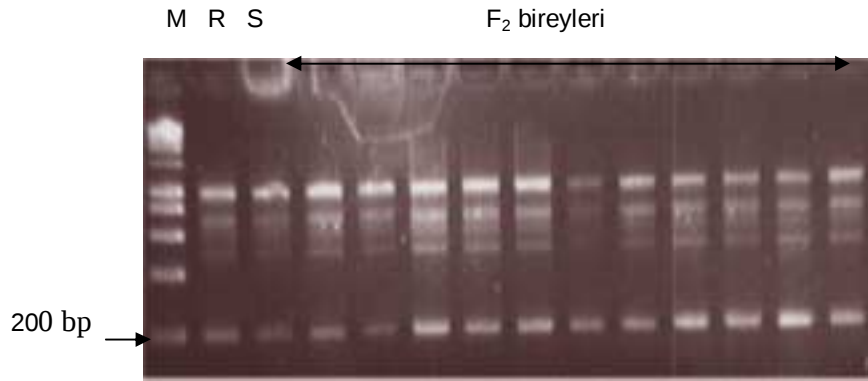
Ön PCR ürünü kullanılarak D1F ve E-ATT primerleriyle elde edilen PCR sonuçları Şekil 4.22’de görülmektedir. Burada da görüldüğü gibi 200 bp büyük ve küçük 2 tane DNA bandı elde edilmiş buna karşılık ebeveynler ve F₂ bireyleri arasında herhangi bir polimorfizm belirlenememiştir.



Şekil 4.22. D1F/E-ATT primerleriyle elde edilen PCR ürünleri

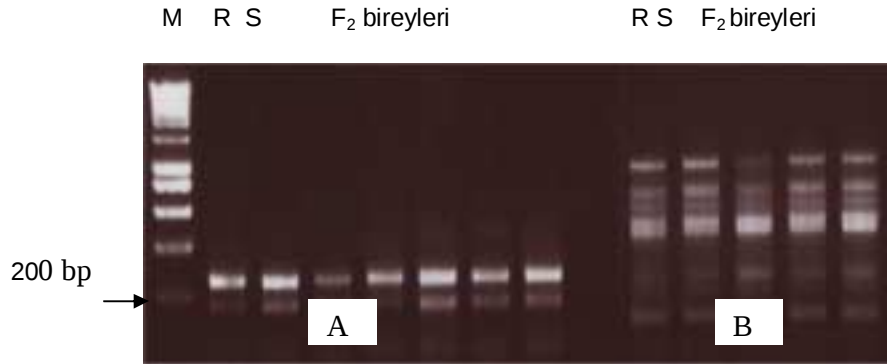
M: Markır (1 kb), R: Dayanıklı ebeveyn S: Duyarlı ebeveyn

Ön PCR ürünü kullanılarak D1R ve M-CAA primerleriyle elde edilen PCR sonuçları Şekil 4.23’de görülmektedir. Bu primer kombinasyonları ile 4 DNA bandı elde edilmiş fakat bu bantların hiçbirisi ebeveynler ve F₂ bireyleri arasında polimorfizm göstermemiştir.



Şekil 4.23. D1R/M-CAA primerleriyle elde edilen PCR ürünleri
M: Markır (1 kb), R: Dayanıklı ebeveyn S: Duyarlı ebeveyn

Ön PCR ürünü kullanılarak D1R/E-ATT (A) ve D1F/M-CAA (B) primerleriyle elde edilen PCR sonuçları Şekil 4.24’de görülmektedir. D1R/E-ATT primer kombinasyonu ile 2 DNA bandı elde edilmesine rağmen ebeveynler arasında polimorfizm gözlenmemiştir. D1F/M-CAA primer kombinasyonlarıyla ise smear bir yapı elde edildiği için değerlendirilememiştir.



Şekil 4.24. D1R/E-ATT (A) ve D1F/M-CAA (B) primerleriyle PCR
M: Markır (1 kb), R: Dayanıklı ebeveyn S: Duyarlı ebeveyn

4.10. AFLP Moleküler Markır Tartışma

AFLP markırları, restriksiyon enzimleriyle kesilen DNA'nın bu enzimlere özgü adaptörle birleştirilmesinden sonra peş peşe yapılan PCR reaksiyonlarının ardından poliakrilamid jelde yürütülmesine dayanır (Vos ve ark., 1995). Adaptör ve restriksiyon dizisi, primerlerin bağlanma yeri olarak görev yapmakta ve primerlerin 3' ucuna seçici bazlar eklenerek PCR yapılmaktadır. DNA bantlarının poliakrilamid jeldeki çözünürlüğüne göre seçici baz sayısı artırılmaktadır. Seçici PCR aşamasında primerlerin biri P^{33} ile işaretlenerek PCR yapılmakla birlikte işaretleme olmadan gümüş nitrat boyamasıyla da DNA bantları görüntülenmektedir.

AFLP markırları, genomda çok fazla genetik lokusu analiz ettiği için moleküler markır oluşturmak için sıkça başvurulmuş DNA parmak izi metodudur. Lin ve ark (1996), soyanın genetik haritasını yapmada RFLP, RAPD ve AFLP markırlarını kullanmışlar ve bu markırlardan AFLP'nin polimorfizm bulmada diğerlerinden çok daha üstün olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle türler arası ve tür içi genetik çeşitlilik araştırmalarında (Folkerstma ve ark., 1996; Hongtrakul ve ark., 1997; Semblat ve ark., 1998) ve dayanıklılık genlerine bağlı markır oluşturma çalışmalarında (Lu ve ark., 1998; Lu ve ark., 1999; Xu ve Kobran, 2000) yoğun şekilde kullanılmıştır. Bununla birlikte AFLP tekniğiyle gene bağlı markırları tanımlamada güvenilir ve güçlü bir teknik olmasına rağmen, MAS ve haritaya dayalı klonlama çalışmaları için dominant markır olması, yüksek maliyeti, çok fazla iş gücü gerektirmesi gibi nedenlerden dolayı önemli bir dezavantaja sahiptir (Dussle ve ark., 2002). Bu güçlükler AFLP markırının PCR'a dayalı markıra çevrilmesiyle aşılabilmektedir. Havuç (Bradeen ve Simon, 1998), brassica (Negi ve ark., 2000), kuşkonmaz (Reamon-Büttner ve ark., 2000), soya (Meksem ve ark., 2001), elma (Xu ve ark., 2001), arpa ve buğday (Shan ve ark., 1999) gibi farklı bitki türlerinde AFLP markırları PCR'a dayalı markırlara kolaylıkla çevrilebilmiştir.

Kullanılan 100 tane EcoRI/MseI AFLP primer kombinasyonu kullanılmış olup bunlardan 92 tanesinde PCR ürünü elde edilmesine rağmen 8 tane primer kombinasyonunda ise PCR ürünü elde edilememiştir. Polimorfizm veren 2 tane EcoRI/MseI primer kombinasyonunun ise ebeveynler ve dayanıklı/duyarlı havuzlar

arasında polimorfizm verdiği görülmüştür. Bu markırlar, havuzları oluşturan F₂ bireyleri analiz edildiğinde, 10 tane dayanıklı bireyde görülmesine rağmen, 10 tane duyarlı bireyde görülmemiştir. Bu bantların, *mj* genine bağlı olduğu düşünülmüştür. Bu iki markırın da genimize coupling (*cis*) durumunda bağlı olduğu belirlenmiştir. Eğer markırımız duyarlı bireylerde görülmüş olsaydı bu durumda markırımız genimize repulsing (*trans*) durumunda bağlı olacaktı. Çalışan 92 tane primer kombinasyonlarında AFLP bantları *cis* ve *trans* durumları incelenmiş olup yalnızca yukarıda sözü edilen *cis* durumunda 2 markır belirlenebilmiştir.

mj genine bağlı olduğu düşünülen bu 2 AFLP markırı jelden kesilmiş ve klonlama yapıldıktan sonra sekans edilerek primerler oluşturulmuştur. Geliştirilen primerler kullanılarak ebeveynlerle PCR yapılmış fakat polimorfizm belirlenememiştir. Bu durum AFLP markır sisteminin doğasından kaynaklanmaktadır. AFLP çalışmasında geliştirilen primerler çoğunlukla ebeveynler arasında polimorfizm vermemekte yada birkaç baz farklılık göstermektedir. Birkaç baz farklılık ancak poliakrilamid jelde görüldüğü için çok etkin olmamakta ve rutin analizlerde kullanılamamaktadır. Bu markırları SCAR veya CAPS'a çevrilerek söz konusu olumsuzluklar aşılabilmektedir. Burada en önemli durum AFLP bandının sahip olduğu uzunluğudur. 200 bp'den büyük AFLP DNA bantları SCAR'a çevrilmekte eğer dizi uzunluğu 200 bp'den küçük ise bu bantların uzunluğunu artırmak için iPCR (inverse PCR) yapmak gerekmektedir (Jong ve ark., 1997).

E-AAC/M-CTG AFLP primeriyle elde edilen 70 bp uzunluğundaki DNA bandı dayanıklı ve duyarlı ebeveynler arasında polimorfizm göstermediğinden PCR'a dayalı moleküler markır olarak değerlendirilememiştir. Polimorfizm bulmak için bu bandın uzunluğunun iPCR tekniği kullanılarak artırılması gerekiyordu. Tekniğin kendi içindeki dezavantajından dolayı üzerinde yoğunlaşılmamıştır. E-ATT/M-CAA AFLP primerleriyle elde edilen 190 bp uzunluğundaki DNA bantları dayanıklı ve duyarlı ebeveynler enzim kesim haritası incelenmiştir. Polimorfizm veren bölgeye özgü kesim enzimi olup/olmadığı araştırılmış ve bu bölgenin herhangi bir enzim tanıma bölgesi taşımadığı için bu AFLP markırı CAPS markırına çevrilememiştir. Eğer co-dominant CAPS markırı geliştirilmiş olsaydı geniş popülasyondaki F₂ bireyleri taranarak bu markırın *mj* genine olan uzaklığı ve MAS

için uygun olup/olmadığı da ortaya koyulacaktı. CAPS markırının geliştirilememesi nedeniyle bu düşünceler gerçekleştirilememiştir. Ayrıca 3' ucunda tek baz farklılık taşıyan primerlerle yapılan PCR çalışmasında ise her iki ebeveynde de PCR ürünü elde edilmemiştir. Bu durum AFLP markırının diğer markır sistemlerine göre daha zor PCR'a dayalı markıra çevrilmesi ve kimi zamanda polimorfizmin kaybedilmesinden kaynaklanmaktadır (Shan ve ark., 1999). Elde ettiğimiz sonuçlar bu verilerle paralellik göstermiştir. Jong ve ark (1997), AFLP-BSA tekniğini kullanarak patatesten patates X virüsü'ne karşı dayanıklılığı sağlayan *Nb* genine bağlı markır tanımlamak için 96 tane AFLP primer kombinasyonu kullanmışlar ve 9600 tane DNA bandının yalnızca 8 tanesi *Nb* genine bağlı olduğunu belirlemişlerdir. Bunlardan yalnızca SPUD237 ve GP21'i olarak adlandırılan iki markır CAPS'a dönüştürebilmişlerdir. Başka bir çalışmada, 176 tane AFLP primer kombinasyonunu elmada külleme hastalığına (*Podosphaera leucotricha*) karşı dayanıklılığı sağlayan *PI-w* genine bağlı moleküler markırları oluşturmak için kullanmışlardır (Evans ve James, 2003). Bu primerler içinden 7 tane kombinasyon, dayanıklı ve duyarlı havuzlar arasında farklılık göstermiş ve iki tanesinin (EM M01 ve EM M02) *PI-w* genine, 4,6 ve 6,4 cM uzaklıkta olduğu bildirmişler ve bunları SCAR'a dönüştürmüşlerdir.

Bu çalışmada 100 primer kombinasyonundan (11150 genetik lokus) yalnızca 2 tane markırın potansiyel markır olabileceği görülmüştür. Literatür araştırmalarında belirtilmemesine rağmen ön PCR ürünleri, geliştirilen primerlerle ve AFLP seçici primerleriyle PCR yapılarak ebeveynler arasında polimorfizm araştırılmış fakat belirlenememiştir.

AFLP çalışmasında belirlenen 2 tane markırdan geliştirilen 4 tane seçici primer diğer çalışmalarda kullanılmak üzere önemli bir veri oluşturmuş olup, bunlar SRAP primerleriyle PCR yapılarak *mj* genine bağlı moleküler markır geliştirmede kullanılmıştır.

4.11. SRAP Moleküler Markır Bulguları

Bu çalışmada, SRAP primerleri hıyar genomuna ait spesifik primerler ile birlikte kullanılarak polimorfizm bulmak amaçlanmıştır. Bunun için, 112 tane primer

kombinasyonu kullanılmış olup, 11 tane primer kombinasyonunun ebeveynler arasında polimorfizm verdiği belirlenmiştir. 112 tane primer kombinasyonuyla her bir ebeveynde 336 tane genetik lokus belirlenmiştir.

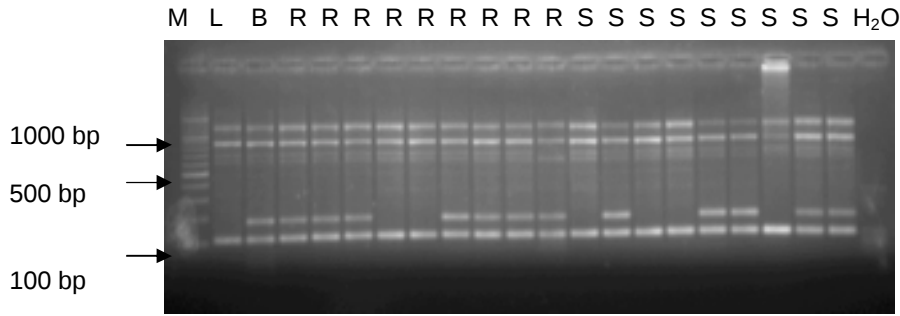
SRAP primerleriyle hıyar genomuna ait seşiçi primerlerle yapılan kombinasyonlar izelge 4.10’da grlmektedir. Öncelikle bu kombinasyonlar kullanılarak ebeveynler (Lucia ve Batem1) arasında polimorfizm araştırılmıştır. Çizelge 4.10’da belirtildiği gibi 112 primer kombinasyonuyla yapılan PCR sonucu yalnızca 11 tane primer kombinasyonu ile ebeveynler arasındaki polimorfizm elde edilmiştir.

Çizelge 4.10. SRAP-AFLP Primer Kombinasyonları

Kombinasyon	Polimorfizm	Kombinasyon	Polimorfizm
D1F/Me1	-	D17F/Me1	-
D1F/Me2	-	D17F/Me2	-
D1F/Me3	-	D17F/Me3	-
D1F/Me4	-	D17F/Me4	-
D1F/Me5	-	D17F/Me5	-
D1F/Me6	-	D17F/Me6	-
D1F/Me7	+	D17F/Me7	-
D1F/Me8	-	D17F/Me8	-
D1F/Me9	-	D17F/Me9	-
D1F/Me10	-	D17F/Me10	-
D1F/Me11	-	D17F/Me11	-
D1F/Me12	-	D17F/Me12	-
D1F/Em1	-	D17F/Em1	-
D1F/Em2	-	D17F/Em2	-
D1F/Em3	+	D17F/Em3	-
D1F/Em4	-	D17F/Em4	-
D1F/Em5	-	D17F/Em5	-
D1F/Em6	-	D17F/Em6	-
D1F/Em7	-	D17F/Em7	-
D1F/Em8	-	D17F/Em8	-
D1F/Em9	-	D17F/Em9	-
D1F/Em10	-	D17F/Em10	-
D1F/Em11	-	D17F/Em11	-
D1F/Em12	-	D17F/Em12	-
D1F/Em13	-	D17F/Em13	+
D1F/Em14	-	D17F/Em14	-
D1F/Em15	-	D17F/Em15	-
D1F/Em16	-	D17F/Em16	-
D1R/Me1	-	D17R/Me1	-
D1R/Me2	-	D17R/Me2	-
D1R/Me3	-	D17R/Me3	-
D1R/Me4	-	D17R/Me4	-
D1R/Me5	-	D17R/Me5	-
D1R/Me6	-	D17R/Me6	-
D1R/Me7	-	D17R/Me7	-
D1R/Me8	-	D17R/Me8	-
D1R/Me9	-	D17R/Me9	-
D1R/Me10	-	D17R/Me10	+
D1R/Me11	-	D17R/Me11	-
D1F/Me12	-	D17R/Me12	-
D1R/Em1	-	D17R/Em1	+
D1R/Em2	-	D17R/Em2	-
D1R/Em3	-	D17R/Em3	-
D1R/Em4	+	D17R/Em4	-
D1R/Em5	-	D17R/Em5	-
D1R/Em6	-	D17R/Em6	-
D1R/Em7	-	D17R/Em7	-
D1R/Em8	-	D17R/Em8	-
D1R/Em9	-	D17R/Em9	-
D1R/Em10	-	D17R/Em10	+
D1R/Em11	-	D17R/Em11	-
D1R/Em12	-	D17R/Em12	-
D1R/Em13	-	D17R/Em13	-
D1R/Em14	+	D17R/Em14	-
D1R/Em15	-	D17R/Em15	-
D1R/Em16	-	D17R/Em16	-

+: Polimorfizm var; -: Polimorfizm yok

D1R-Em4 primer kombinasyonu ile elde edilen PCR ürünleri ile ilgili sonuçlar Şekil 4.25’de görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi, dayanıklı ebeveynde (Lucia) 3 tane, duyarlı ebeveynde (Batem1) ise 4 tane DNA bandı elde edilmiştir. Yaklaşık 190 bp uzunluğunda DNA bandı dayanıklı ebeveynde olmadığı halde duyarlı ebeveynde görülmüştür. Bu polimorfik bandın F_2 bireylerinde açılım gösterdiği belirlenmiştir.



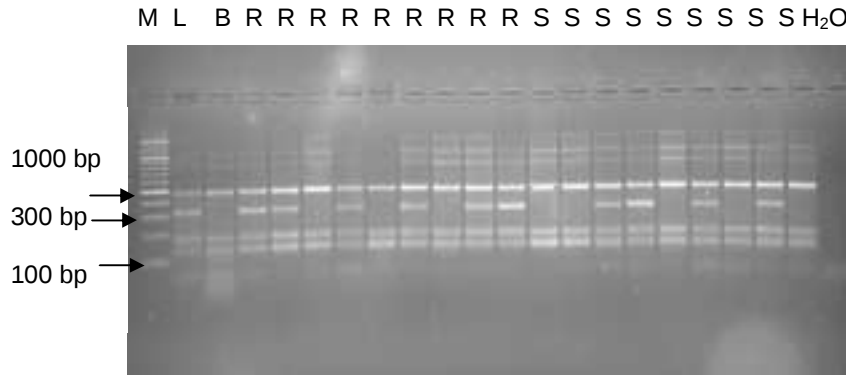
Şekil 4.25. D1R-Em4 primer kombinasyonu ile elde edilen PCR ürünleri
M: Markır (1 kb), L: Lucia, B: Batem1, R ve S: F_2 bireyleri

D1F-Em3 primer kombinasyonu ile elde edilen PCR ürünleri sonuçları Şekil 4.26’da görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi, dayanıklı ve duyarlı ebeveynde 6 tane DNA bandı belirlenmiştir. Dayanıklı ebeveynde bulunan 290 bp uzunluğundaki DNA bandı duyarlı ebeveynde bulunmadığı, buna karşılık duyarlı ebeveynde bulunan yaklaşık 310 bp uzunluğundaki DNA bandı ise dayanıklı ebeveynde görülmemiştir. Her iki polimorfik DNA bantları F_2 bireylerinde açılım göstermiştir.



Şekil 4.26. D1F-Em3 primer kombinasyonu ile elde edilen PCR ürünleri
Markır (1 kb), L: Lucia, B: Batem1, R ve S: F_2 bireyleri

D1F-Me7 primer kombinasyonu ile elde edilen PCR ürünleri sonuçları Şekil 4.27’de görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi, dayanıklı ebeveynde 4 tane, duyarlı ebeveynde ise 3 tane DNA bandı elde edilmiştir. Yaklaşık 310 bp uzunluğunda DNA bandı dayanıklı ebeveynde bulunmasına rağmen duyarlı ebeveynde bulunmamış ve bu polimorfik bandın F_2 bireylerinde açılım gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.27. D1F-Me7 primer kombinasyonu ile elde edilen PCR ürünleri
M: Markır (1 kb), L: Lucia, B: Batem1, R ve S: F_2 bireyleri

D1R-Em14 primer kombinasyonu ile elde edilen PCR ürünleri sonuçları Şekil 4.28’de görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi, dayanıklı ebeveynde 6 tane, duyarlı ebeveynde 7 tane DNA bandı elde edilmiştir. Yaklaşık 200 bp uzunluğunda DNA bandı dayanıklı ebeveynde bulunmasına rağmen duyarlı ebeveynde, 250 bp uzunluğundaki DNA bandı ise duyarlı ebeveynde olmasına rağmen dayanıklı ebeveynde gözlemlenmemiştir. Bu 3 tane polimorfik DNA bantları F_2 bireylerinde açılım gösterdiği belirlenmiştir.



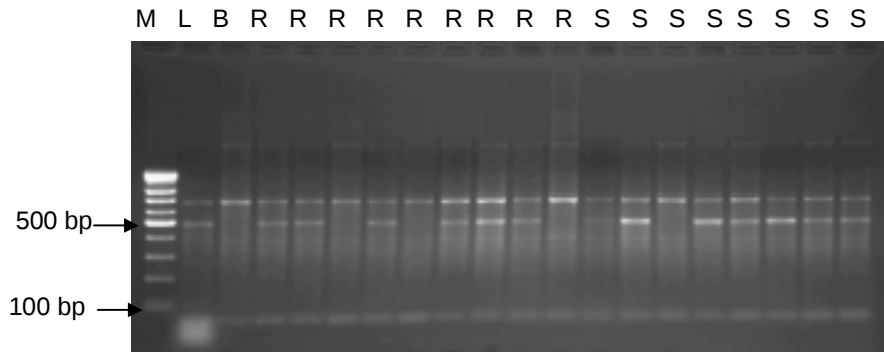
Şekil 4. 28. D1R-Em14 primer konbinasyonu ile elde edilen PCR ürünleri
M: Markır (1 kb), L: Lucia, B: Batem1, R ve S: F_2 bireyleri

D17R-Em10 primer kombinasyonu ile elde edilen PCR ürünleri ile ilgili sonuçlar Şekil 4.29'da görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi, dayanıklı ve duyarlı ebeveynde 3 tane DNA bandı elde edilmiştir. Yaklaşık 200 bp uzunluğunda DNA bandı duyarlı ebeveynde bulunmasına rağmen duyarlı ebeveynde, 190 bp uzunluğundaki DNA bandı ise dayanıklı ebeveynde olmasına rağmen duyarlı ebeveynde gözlemlenmemiştir. Bu 2 tane polimorfik DNA bantlarının F_2 bireylerinde açılım gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4. 29. D17R-Em10 primer kombinasyonu ile elde edilen PCR ürünleri
M: Markır (M), L: Lucia, B: Batem1, R ve S: F_2 bireyleri

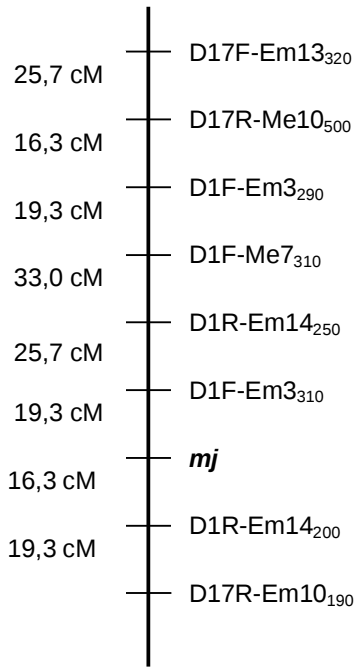
D17R-Me10 primer kombinasyonu ile elde edilen PCR ürünleri sonuçları Şekil 4.30'da görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi, dayanıklı ebeveynde 2 tane duyarlı ebeveynde ise 1 tane DNA bandı elde edilmiştir. Dayanıklı ebeveynde bulunan 500 bp uzunluğunda DNA bandı duyarlı ebeveynde bulunmamış ve bu polimorfik DNA bandın F_2 bireylerinde açılım gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4. 30. D17R-Me10 primer kombinasyonu ile elde edilen PCR ürünleri
M: Markır (M), L: Lucia, B: Batem1, R ve S: F_2 bireyleri

Polimorfizm veren 11 tane primer kombinasyonu dayanıklı ve en duyarlı 38 tane F_2 bitkisinde analiz edilerek açılım durumuna bakılmıştır. Bu veriler Kosambi (1944) fonksiyonu ve MAPMAKER Exp. 3.0 (Lander ve ark., 1987) programı kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz sonucuna göre ebeveynler arasında polimorfizm veren 11 tane primer kombinasyonunun 8 tanesi birbirleriyle bağlantılı olduğu, 3 tanesinin ise bu gruba bağlı olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. Markırların *mj* genine olan uzaklıkları



mj genine en yakın markırların D1R-Em14₂₀₀ (16,3 cM) ve D1F-Em3₃₁₀ (19,3 cM) olduğu diğerlerinin ise gene çok uzak oldukları ve bu 8 markırın *mj* ile aynı bağlantı grubunda olduğu görülmüştür (Çizelge 4.11). Markırların analizinde iki markır arasındaki uzaklık 37,2 cM alındığı için, birbirlerine uzaklıkları 37,2 cM'dan daha uzak olan markırlar başka bir bağlantı grubunda oldukları görülmüştür.

4.12. SRAP Moleküler Markır Tartışma

SRAP markırı genlerin ORF bölgesine özgü iki farklı primerin (reverse ve forward) PCR'ına dayanmaktadır. Primerlerin uzunlukları 17 veya 18 bazdan

oluşmaktadır. Forward primerinde 5' ucundan itibaren 10 baz sabit olup bunları CCGG, reverse primerinde ise 11 baz sabit olup bunları AATT içermektedir. Her iki primerde de bu dizileri takiben 3 seçici baz içermektedir (Li ve Quiros, 2001). Bu seçici bazlar polimorfizm bulmayı sağlamaktadır.

SRAP markırları, RFLP ve AFLP markırlarına göre uygulanması kolay işgücü gereksinimi az ve maliyeti düşüktür. RAPD markırlarına göre ise daha güvenilir sonuçlar vermektedir. SRAP markırlarının % 20'si co-dominant markır özellik taşımaktadır (Li ve Quiros, 2001).

SRAP markırları son yıllarda geliştirilmiş olup genetik çeşitliliği araştırma çalışmalarında (Ferriol ve ark, 2003; Budak ve ark, 2004) ve genlerin belirlenmesinde (Li ve Quiros, 2001; Li ve ark, 2003) kullanılmıştır. Bu çalışmada SRAP primerleri birbirleriyle değil, hıyar genomuna ait seçici primerler ile eşleştirilerek PCR yapılmıştır. Çünkü laboratuvarımızda domates, hıyar, incir ve biber gibi farklı bitki türlerinde yapılan çalışmalarda SRAP markırlarının polimorfizm oranının sınırlı olduğu görülmüştür (yayınlanmamış veri). Literatür olarak kullanılmasına rastlanılmadığı halde bu araştırmada AFLP-SRAP kombinasyonları çalışılmıştır. Bunun için AFLP markır sistemiyle *mj* genine bağlı olduğu düşünülen 2 tane AFLP bandının klonlanması sonucu geliştirilen hıyar genomuna ait spesifik 4 tane primer (D1F, D1R, D17F ve D17R) SRAP primerleri ile birlikte PCR yapılmıştır. Yapılan çalışmada kullanılan 112 tane kombinasyondan 11'nin ebevenler arasında polimorfizm verdiği belirlenmiştir. *mj* genine en yakın markırların D1R-Em14₂₀₀ (16,3 cM) ve D1F-Em3₃₁₀ (19,3 cM) olduğu diğerlerinin ise gene çok uzak oldukları bulunmuştur. Polimorfizm veren 11 tane markırdan sadece 8 tane markırın *mj* ile aynı bağlantı grubunda olduğu görülmüştür (Çizelge 4.11). Markırların analizinde iki markır arasındaki uzaklık 37,2 cM alındığı için birbirlerine uzaklıkları 37,2 cM'dan daha uzak olan markırlar başka bir bağlantı grubunda görülmüştür. Oluşturulan kombinasyonlar, markırların kendi başına kullanılmasından daha iyi polimorfizm verdiği ve bu polimorfizmlerin ilgili genimizle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu sistem AFLP markırlarımızın *mj* geniyle ilişkili olduğu gene yakın bir markır veya genin bir bölgesine özgü olabileceğini göstermiştir.

Bu çalışmada *mj* genine bağlı markır oluşturmak için dominant markırlar (RAPD, SCAR, AFLP ve SRAP) ile bir adet co-dominant markır (SSR) kullanılmıştır. *mj* genin resesif olması dominant markırın kullanılmasında bazı güçlükleri taşıdığı görülmüştür. F_2 bireyleri, F_3 'e götürülemediğinden, test edilen bitkilerin homozigot duyarlı (RR) veya heterezigot duyarlı (Rr) olduğu belirlenemediğinden markırların geniş populasyonda çalışılmasını sınırlandırmıştır. Bu sınırlandırıcı durumu aşmak için polimorfizm veren markırlar dayanıklı ve en duyarlı F_2 bitkilerinde kullanılarak markırlar taranmıştır. Bu durum markırları taramada kullanılan F_2 bireylerinin sayısını sınırlandırmıştır. Bu olumsuzluğu gidermek için F_2 bireylerinin kendilenerek F_3 götürülmesi ve F_3 bireylerinin test edilerek bitkilerin homozigot ve heterezigot durumlarının ortaya koyulması gerekmektedir. F_2 bitkileri nematodla test edildiğinde inokulasyondan dolayı bitkilerden tohum alınamadığı için F_3 'e götürülememiştir. Değişik araştırmalarda markırların ilgili gene olan uzaklıklarını belirlemek için yapılan çalışmalarda, değişik sayıda F_2 ve RIL veya BC_1 bireyleri kullanılmaktadır. Lu ve ark (1998), şeftalide Kök-ur nematodlarına dayanıklılık sağlayan genle ilgili moleküler markır oluşturmak için 55 tane F_2 bireyi, Agrama ve ark (2004), mısırdaki *Peronosclerospora sorghi*'ye karşı 94 tane RIL kullanmışlardır. Bu çalışmada populasyon sayısının sınırlı tutulması istatistiksel olarak hata oranını artıracağı düşünüldüğü için fenotipik açıdan çok emin olunan örnekler haritalamada kullanılmıştır.

Dayanıklılık genlerine bağlı markır oluşturmada çoğunlukla RFLP, RAPD ve AFLP gibi moleküler markırlar kullanılmaktadır. RFLP, RAPD ve AFLP ile gene yakın markırlar belirlenirse bu markırlar ıslah çalışmalarında rutin olarak kullanılması için SCAR ve CAPS'a çevrilmektedir (Lu ve ark., 1998; Agrama ve ark., 2004). RFLP ve AFLP gibi markırlar kullanılarak geliştirilen markırı ıslahta kullanmak güçlü laboratuvar alt yapısına, finansman kaynağına, büyük iş gücüne, uzman personele ve zamana gereksinim vardır. RAPD tekniği ise uygulaması basit ve hızlı olmakla birlikte tekrarlanabilirliğinin zayıf olması ve laboratuvarlar arasında standardize edilmesi zor olduğu için dayanıklılık ıslahı çalışmalarında rutin olarak kullanılamamaktadır. Her üç markırdaki (RFLP, AFLP ve RAPD) bu olumsuzluklar daha ekonomik, uygulaması basit ve hızlı, sonuçları güvenilir olan SCAR ve CAPS'a

çevrilerek kullanılmaktadır. Ayrıca CAPS markırları codominant özellik taşıdığı için ıslah çalışmalarında büyük önem taşımaktadır (Williamson ve ark., 1994). SRAP-AFLP sonucu geliştirilen markırları ıslahta rutin kullanılması için SCAR ve CAPS'a çevrilme zorunluluğu bulunmadığı için dayanıklılık ıslahında rutin şekilde kullanılabileceği belirlenmiştir.

4.13. SSR Moleküler Markır Bulguları

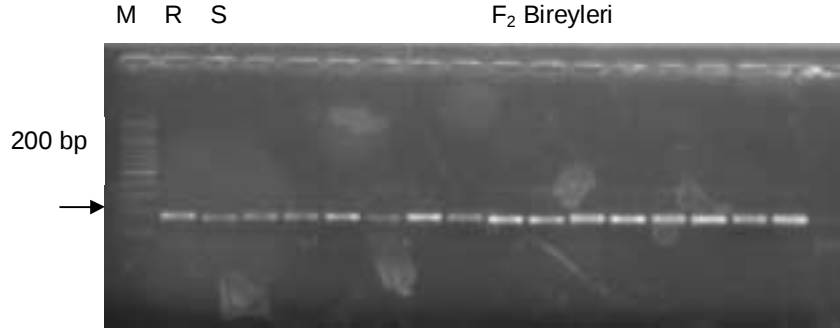
SSR PCR ürünlerinin, standart ve SFR agarozda yürütülmesi sonucu elde edilen sonuçlar Çizelge 4.12'de görülmektedir. Burada 22 tane SSR markırının her iki agaroz sisteminde polimorfizm vermediği ancak CMCTT144 olarak adlandırılan SSR primerinin SFR agarozda ebevenyler arasında polimorfizm verdiği standart agarozda ise polimorfizm vermediği görülmüştür.

Çizelge 4.12. SSR primerlerinin standart agaroz ve SFR agarozdaki PCR sonuçları

SSR Primer	Standart Agaroz	SFR Agaroz	Uzunluk (bp)
CMGA15	-	-	150
CMCT44	-	-	104
CMACC146	-	-	152
CMCTT144	-	+	192
CMTC47	-	-	168
CMCCA145	-	-	142
CMGA172	-	-	114
CMTC123	-	-	106
CMGT108	-	-	187
CMTAA166	-	-	167
CMGA165	-	-	97
CMCT160a	-	-	88
CMTC160a+b	-	-	215
CMCT505	-	-	219
CSCTTT15a	-	-	198
CSGTT15b	-	-	161
CSTCC813	-	-	144
CSCT335	-	-	120
CMTC51	-	-	160
CSAT214	-	-	111
CSAT425a	-	-	93
CSCCT571	-	-	209
CSTA050	-	-	163

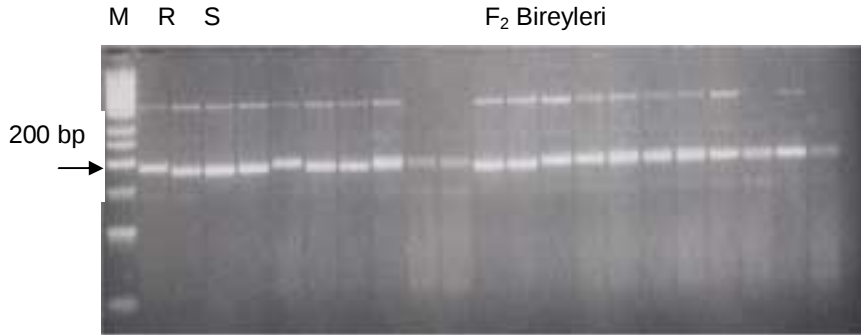
- : Polimorfizm yok, + : Polimorfizm var

Standart agarozda CMCTT144 SSR primeriyle elde edilen PCR ürünleri sonuçları Şekil 4.31’de görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi ebeveynler ve F₂ bireyleri arasında polimorfizm görülmemektedir.



Şekil. 4.31. Standart agarozda CMCTT144 SSR primeriyle elde edilen PCR ürünleri

SFR agarozda CMCTT144 SSR primeriyle elde edilen PCR ürünleri ile ilgili sonuçlar Şekil 4.32’de görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi SFR agarozda ebeveynler arasında polimorfizm belirlenmiştir. Bu polimorfizm bazı F₂ bireylerinde belirlenmesine rağmen MapMaker analizi sonucu *mj* geni ile ilişkili olmadığı görülmüştür.



Şekil 4.32’da SFR agarozda CMCTT144 SSR primeriyle elde edilen PCR ürünleri

4.14. SSR Moleküler Markır Tartışma

SSR markırları, yüksek yapılı organizmalarda görevleri bilinmeyen, düzenleyici rollere sahip olduğu düşünülen tesadüfî tekrarlanan DNA dizileridir (Rafalski ve Tingey, 1993). Basit tekrarlı diziler (SSR) aynı zamanda mikrosatellit

(mikrosatellitites) olarak da adlandırılırlar. SSR'lar genomda çeşitli sayıda birbiri ardına dizilmiş 1-5 nükleotid tekrarlı, yüksek bilgi verici, lokus spesifik genetik markırlardır (Katzir ve ark, 1996). Geliştirilen forward ve reverse primerleri ile PCR yapıldığında tekrarlı dizilimin uzunluğuna göre iki birey arasında farklılık belirlenebilmektedir. PCR ürünündeki uzunluk varyasyonu, SSR'ın sayısının farklılığından ileri gelmektedir. SSR yöntemiyle bireyler arasındaki baz farklılığı genelde çok az (1-20 bp) olduğu için ürünler poliakrilamid veya yüksek çözünürlüğe sahip agarozlar kullanılarak birbirlerinden ayrırtedilmektedirler. Bununla birlikte SSR markırları lokus spesifik olmalarından dolayı birbirlerine yakın türler arasında polimorfizm bulmak diğer markırlara göre daha zordur. Fakat SSR ile bulunan markır daha fazla bilgi içerdiği için diğer markırlardan (RAPD, AFLP vb) daha büyük önem taşımaktadır. Bununla birlikte bitki türlerinde belirlenen SSR markır sayısı sınırlıdır. Çünkü SSR markırı geliştirmek için DNA sekans bilgisine ihtiyaç duyulmaktadır.

Izoenzim, RAPD ve RFLP gibi markırların hıyarda polimorfizm oranları düşük olduğu için MAS kullanımları sınırlıdır. Bunun için genom hakkında daha spesifik bilgi veren SSR markırları kullanılmaya başlanmıştır. Cucurbitaceae familyasının farklı türlerinde SSR ile yapılan çalışmalarda yüksek düzeyde polimorfizm (% 60) belirlenmiştir (Katzir ve ark., 1996). Çalışmamızda bu polimorfizm oranı dikkate alınarak hıyarın genetik haritasında linkage (bağlantı) yeri bilinen 23 SSR primerlerinin (Katzir ve ark., 1996) ebeveynler arasında polimorfizm verip/vermediği çalışılmıştır. Ebeveynler arasında baz farklılığı çok az sayıda olacağı için PCR ürünleri hem agarozda hemde SFR agarozda yürütölmüştür. Baz farklılığı az olduğu için SFR agarozda polimorfizm belirlenmiştir.

SSR'lar, lokusa özgü olmalarından dolayı eukaryatlarda özellikle genom haritalarının yapılmasında yoğun şekilde kullanılmış olup (Beckmann ve Soller, 1990) mısır (Senior ve Heun, 1993), çeltik (Wu ve Tanksley, 1993), arabidopsis (Bell ve Decker, 1994) ve soya (Akkaya ve ark., 1995) gibi çok farklı bitki türlerinde çalışılmıştır. Son yıllarda dayanıklı genlerle ilgili moleküler markır geliştirmek için kullanılmaya başlanmıştır. Bezawada ve ark (2003), *M. incognita*'ya orta düzeyde dayanıklı "Clevewilt 6-1" pamuk çeşidi ile duyarlı "Stoneville 213" çeşidinin

melezlenmesi sonucu geliştirilen F₂ bireylerinde yapılan çalışmada dayanıklılığın resesif tek gen (3:1) tarafından kontrol edildiğini, bu gene bağlı markırı belirlemek için kullandıkları 120 SSR primerinden BNL 1421 ve BNL 1669 markırlarının gene 15,4 cM mesafede olduğunu fakat markırların ikincisinde genle anormal bir açılım gösterdiklerini belirlemişlerdir. Mian ve ark (1999), soyada *Cercospora sojina* (Hara) fungal hastalık etmenine dayanıklılığı kontrol eden *Rcs3* genine bağlı markır oluşturmak için bağlantı grubunda yeri bilinen ve hastalığa dayanıklılığı kontrol eden gen gruplarıyla birlikte bulunan 50 tane SSR markırlarından Satt244 ve Satt547 olarak isimlendirilen markırlarının gene bağlı olduğunu belirlemişlerdir. Bir diğer araştırmada da Agrama ve ark (2004), arpada fungal patojen *Puccinia coronata* var. *hordei*'ye karşı dayanıklılık sağlayan *Rpc1* genine karşı markır belirlemek için 500 tane RAPD, 71 tane RFLP ve 200 tane SSR markırı kullanmışlar ve 15 tane RAPD, 32 tane RFLP ve 62 tane SSR ebeveynler arasında polimorfizm vermiş (32 tane polimorfik bant) ve gene en yakın (2,5 cM) OPA08-700 RAPD markırının olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, 23 SSR markırından 1 tanesinin ebeveynler arasında polimorfizm verdiği belirlenmiş bununda *mj* geni ile ilişkisi olmadığı görülmüştür. Bu durum da markırın gene uzak olması (%50 cM'dan fazla) veya gene aynı grupta olmamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte hıyar genomuna ait az sayıda (bilinen) SSR markırı ile çalışılmış olması ve birbirlerine yakın ebeveynlerde çalışılmış olması polimorfizm bulmayı güçleştirmektedir. Katzir ve ark (1996), tarafından hıyar ve kavun genomundan geliştirilen SSR'lar, bu türleri oluşturan farklı özelliklere sahip çeşitlerini birbirlerinden ayırmak için kullanmışlardır. Kabakgilerde şu ana kadar herhangi bir SSR markırının dayanıklılık geniyle ilişkili olmadığı bilinmektedir. Çünkü şu ana kadar az sayıda SSR markırı geliştirilmiştir. Yeni SSR markırlarının geliştirilmesi ve bunların kromozomda yerlerinin biliniyor olması yeni geliştirilecek markırların daha anlamlı olmasını sağlayacaktır. Hıyarda linkage haritası tam olarak doyurulmamıştır. Bunun için yeni SSR markırlarının geliştirilmesi linkage haritasının daha hızlı şekilde oluşturulmasını hızlandıracaktır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Kök-ur nematodlarına (*M. arenaria*, *M. javanica* ve *M. hapla*) dayanıklı “Lucia”, “Shelby” ve “Manteo” saf hatlarıyla (RIL), duyarlı “Batem1” ve “Batem2” olarak adlandırılan saf hatlar melezleme yapılarak F₁ bitkileri ve F₁ bitkileri de kendilenerek F₂ bitkileri elde edilmiştir. Ebeveynler, F₁ ve F₂ bitkileri *M. javanica* ırk 1 ile test edilerek dayanıklı ve duyarlı bireyler belirlenmiştir. *M. javanica* ırk 1 ile test edilen bütün F₁ bireylerinin duyarlı olduğu bulunmuştur. F₂ bireylerinin test edilmesi sonucu ise 3:1 (3 duyarlı, 1 dayanıklı) açılım oranının elde edildiği ve Kök-ur nematodlarına karşı dayanıklılığın resesif tek gen (*mj*) tarafından kontrol edildiği belirlenmiştir.

Hıyarda Kök-ur nematodlarına dayanıklılık sağlayan *mj* genine bağlı moleküler markır oluşturmak için; RAPD, SCAR, SSR, AFLP ve SRAP markırları kullanılmıştır. Bu markırlarla öncelikle ebeveynler arasında polimorfizm belirlemek için kullanılmıştır.

37 tane RAPD primeri ebeveynler arasında polimorfizm belirlemek için çalışılmış olup 26 tane primer ile PCR ürünü elde edilmiş fakat 11 tanesinden ise herhangi bir PCR ürünü elde edilememiştir. 26 tane RAPD primeriyle 104 tane genetik lokus analiz edilmiş olup ebeveynler arasında herhangi bir polimorfizm belirlenememiştir. RAPD markırları dominant özellik taşımakla birlikte uygulama kolaylığından ve çoklu lokus olmasından dolayı genetik analiz çalışmalarında yoğun şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte RAPD markırlarının tekrarlanabilirliğinin düşük olması kullanımını sınırlandırmaktadır. Ayrıca birbirine çok yakın tür veya çeşitler arasında polimorfizm bulmak RAPD markırlarıyla zordur. Bunun için haritalama ve markır oluşturma çalışmalarında çok sayıda RAPD primeriyle çalışılması gerekmektedir.

Hıyar bağlantı grubunda yeri bilinen 14 tane SCAR primeri ebeveynler arasında polimorfizm araştırmak için kullanılmıştır. Bu primerlerden 7 tanesinde PCR ürünü elde edilmesine rağmen, 7 tanesinde ise elde edilememiştir. PCR ürünü veren primerler ise ebeveynler (dayanıklı ve duyarlı) arasında polimorfizm vermemiştir. RAPD markırlarıyla MAS devamlı mümkün değildir. Bunun için RAPD markırları SCAR markırlarına dönüştürülmesiyle daha etkin kullanılmaktadır.

Bununla birlikte farklı populasyonlardan geliştiren SCAR primerleri bir diğer populasyonda çalışmamakta veya çalışanlarda polimorfizm bulma ihtimali azalmaktadır. Bunun için üzerinde çalışılan populasyonlardan geliştirilen SCAR primerlerinin kullanılmasının daha anlamlı olacağı ve daha etkin şekilde kullanılabileceği düşünülmektedir.

mj genine bağlı moleküler markır belirlemek için geliştirilen yöntemlerin bir diğerini de AFLP markır sistemidir. Bunun için 100 tane EcoRI-MseI AFLP primer kombinasyonları ile çalışılmış olup bulardan 92 tanesinde PCR ürünü elde edilmiş, 8 kombinasyondan ise PCR ürünü elde edilmemiştir. Her primer kombinasyonunda toplam 45 tane DNA bandı gözlemlenmiş olup hıyar genomunda 11150 genetik bölge analiz edilmiştir. 2 tane EcoRI/MseI (E-ATT/M-CAA ve E-AAC/M-CTG) primer kombinasyonu ile elde edilen DNA bantları hem dayanıklı ebeveynde hem de dayanıklı bireylerin oluşturduğu havuzda belirlenmiş fakat duyarlı ebeveynde ve duyarlı havuzda gözlenmemiştir. Bu kombinasyonlar havuzları oluşturan F₂ bireylerinde (10 dayanıklı ve 10 duyarlı) analize alınmış olup, dayanıklı F₂ bireylerinin hepsinde bu bantlar görülmesine rağmen duyarlı F₂ bireylerinde gözlemlenmemiştir. Bu 2 tane markırın *mj* genine *cis* durumda bağlı olduğu belirlenmiştir. Bu iki DNA bandı poliakrilamid jelden kesilmiş, klonlanmış ve dizilim analizi yapılmıştır. Dizilim analizleri kullanılarak primerler geliştirilmiş ve bu primerler dayanıklı ve duyarlı ebeveynler arasında PCR yapılmıştır. Her iki primer kombinasyonu ebeveynler arasında polimorfizm vermemiştir. Bunun için bu primerler kullanılarak elde edilen DNA bantları jelden kesilmiş, sekans yapılmış ve dizilimler karşılaştırılmıştır. E-ATT/M-CAA AFLP primer kombinasyonları dayanıklı ve duyarlı ebeveynlerden elde edilen 190 bp uzunluğundaki DNA bantları arasında dizilim farklılığı belirlenmiştir. Bu dizilim farklılığı herhangi bir enzim tanıma bölgesine sahip olmadığı için, CAPS'a çevrilemediğinden ebeveynleri ayırmada kullanılamamıştır. Polimorfizm veren bölgeye özgü geliştirilen seçici primerlerle ise PCR ürünü elde edilememiştir. E-AAC/M-CTG AFLP primerleriyle elde edilen 70 bp uzunluğundaki DNA bandı dayanıklı ve duyarlı bireyler arasında dizilim farklılığı göstermediğinden markır olarak kullanılamamıştır. Ayrıca AFLP markır sistemi sonucu elde edilen bu primerler ile polimorfizm veren AFLP

primerleri ön PCR ürünü kullanılarak çalışılmış fakat ebeveynler arasında polimorfizm belirlenememiştir.

AFLP markırları genomda çok fazla genetik lokus analiz ettiği için moleküler markır oluşturmada sıkça başvurulmaktadır. Bununla birlikte AFLP markır sisteminin dominant olması, yüksek maliyeti, çok fazla iş gücü gerekmesi, maliyeti ve kimi durumda doğru bandın klonlanmasında büyük zorluklar bulunmaktadır. AFLP markırları SCAR veya CAPS'a çevrilmesiyle daha kullanılabilir duruma getirilmektedir. Bununla birlikte her polimorfik bant kullanılabilir olmamaktadır. 200 bp'den büyük AFLP DNA bantları SCAR'a daha kolay çevrilebilmekte eğer dizi uzunluğu 200 bp'den küçük ise bu bantların uzunluğunu artırmak için iPCR yapmak gerekmektedir. Bu çalışmada belirlenen 190 bp ve 70 bp uzunluğundaki bantlar SCAR'a çevrilmekle birlikte uzunlukları az olduğu için kullanılabilir polimorfizm elde edilmemiştir. Yeterli sayıda AFLP markırı kullanılmakla birlikte 2 tane polimorfik bandın belirlenmiş olması ebeveynlerin birbirlerine genetik olarak çok yakın olması ve aralarında genetik varyasyonun çok düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

AFLP markır sistemi sonucu geliştirilen 4 tane hıyar genomuna ait seçici primerler (D1F, D1R, D17F ve D17R), SRAP primerleriyle eşleştirilerek PCR yapılmıştır. 112 tane primer kombinasyonu hıyar genomunda 336 tane genetik lokus taranmıştır. 11 tane primer kombinasyonu ebeveynler arasında polimorfizm vermiştir. Bu kombinasyonlar F₂ bireylerinde incelenmiş olup markırların açılım gösterdikleri belirlenmiştir. MapMaker analizi sonucu 8 tane primer kombinasyonunun *mj* geniyle aynı grupta olduğu diğer 3 tane kombinasyonun ise bu grupta bağlantılı olmadığı belirlenmiştir. *mj* genine en yakın markırların D1R-Em14₂₀₀ (16,3 cM) ve D1F-Em3₃₁₀ (19,3 cM) olduğu, diğerlerinin ise gene uzak oldukları görülmüştür. Bu markırların geniş popülasyonlarda kullanılmasıyla gene olan yakınlıkları hakkında daha fazla bilginin elde edileceği düşünülmektedir.

Hıyarın genetik haritasında yeri bilinen 23 tane SSR primerleri ebeveynler arasında polimorfizmi belirlemek için kullanılmıştır. Bu primerlerden 22 tanesi ebeveynler arasında herhangi bir polimorfizm göstermemiştir. Yalnızca CMCTT144 olarak adlandırılan 1 tane SSR primeri ebeveynler arasında polimorfizm verdiği

belirlenmiştir. Bu markır MapMaker programıyla F_2 bireylerinde analiz edilmiş fakat *mj* geni ile bağlantılı olmadığı belirlenmiştir. SSR markırlarının lokus spesifik olması, markırın hangi kromozom veya bağlantı grubunda olduğu hakkında bilgi vermektedir. SSR markırları birbirlerine uzak türleri daha kolay ayırabilmekte, fakat aynı tür içindeki çeşitleri güçlükle ayıramamaktadır. Bunun için genomda yeri bilinen daha çok sayıdaki SSR markırının kullanılması gerekmektedir.

Bu çalışmada kullanılan ebeveynler (*C. sativus* var. *sativus* ve *C. sativus* var. *hardwickii*) aynı türün iki alt türünden oluşmuştur. Bu durum ebeveynler arasında polimorfizm bulmayı sınırlandırmıştır. Ayrıca dayanıklılığı kontrol eden genin resesif olmasından dolayı, F_2 bireylerinde dominant markırların kullanılmasıyla bazı olumsuzluklarla karşılaşmıştır. Bunun için gelecek çalışmalarda; dayanıklı ve duyarlı hatların melezlenmesi sonucu geliştirilen F_2 bireyleri kendilenerek F_3 bireylerinin elde edilmesi veya rekombinat inbred hatların oluşturulması gerekmektedir. Geliştirilen F_3 bireyleri, *M. javanica* ırk 1 ile test edilerek populasyondaki heterozigot duyarlı (Mj/mj), homozigot duyarlı (Mj/Mj) ve homozigot dayanıklı (mj/mj) bitkilerin belirlenmesi gerekmektedir. *M. javanica* ırk 1 ile testleme sonucu heterozigot duyarlı oldukları belirlenen bitkiler elimine edildikten sonra, homozigot duyarlı ve homozigot dayanıklı bitkiler ile çalışılması gerekmektedir. Daha sonra bu çalışmada belirlenen 11 AFLP-SRAP primerler kombinasyonu ile F_3 bitkileri taranarak bu markırların *mj* geniyle olan ilişkisi belirlenebilecektir. Markırların *mj* genine olan uzaklıkları daha net şekilde ortaya koyulacağı için ıslahta kullanılabilme imkanı sağlayabilecektir.

KAYNAKLAR

- AGRAMA, H.A., DAHLEEN, L., WENTZ, M., JIN, Y., and STEFFENSON, B., 2004. Molecular Mapping of the Crown Rust Resistance Gene *Rpc1* in Barley. *Phytopathology*, 94: 858–861.
- AGRAMA, H.A., HOUSSIN, S.F., and TAREK, M.A., 2002. Cloning of AFLP Marker Linked to Resistance to *Peronosclerospora sorghi* in Maize. *Mol. Genet. Genomics*, 267: 814–819.
- AĞDADI, M., 1978. Güney Anadolu Bölgesi'nde Yetiştirilen Kabakgillerde (*Cucurbitaceae*) Zarar Yapan Kök-ur Nematodu Türleri (*Meloidogyne* spp.)'nin Tespiti ile Zarar Oranları ve Yayılışları Üzerine Araştırmalar. Adana Bölge Zir. Müc. Araş. Ens. Md. Teknik Bülten, No: 47.
- AKKAYA, M.S., BHAGWAT, A.A, and CREGAN, P.B., 1992. Length Polymorphisms of Simple Sequence Repeat DNA in Soybean. *Genetics*, 132:1131–1139.
- ALKAN, B., 1962. Türkiye'nin Zararlı Nematod Faunası Üzerinde İlk İncelemeler. *Bit. Kor. Bült.*, 2 (12):17–25.
- BALLVORA, A., HESSELBACH, J., NIEWOHNER, J., LEISTER, D., SALAMINI, F., and GEBHARDT, C., 1995. Marker Enrichment and High-Resolution Map of the Segment of Potato Chromosome VII Harboring the Nematode Resistance gene *Gro1*. *Mol. Gen. Genet.*, 249: 82–90.
- BARKER, K.R., 1985. Nematode Extraction and Bioassays. In Barker, K.R., Carter, C.C., Sasser, J. N., (eds). *Advanced Treatise on Meloidogyne: 2 Methodology*. North Carolina State University Graphics, s. 30.
- BECKMANN, J.S., and SOLLER, M., 1990. Toward a Unified Approach to Genetic Mapping of Eukarotes Based on Sequence Tagged Microsatellite Sites. *Genomics*, 12: 627–631.
- BELL, C.J., and DECKER, J.R., 1994. Assignment of 30 Microsatellite Loci to the Linkage Map of *Arabidopsis*. *Genomics*, 19: 137–144.
- BOERMA, H.R., and HUSSEY, R.S. 1992. Breeding Plants for Resistance to Nematodes. *Journal of Nematology*, 24 (2): 242–252.

- BORA, A. 1970. Karadeniz Bölgesi Bitki Parazit Nematodlarının Tür ve Yayılış Alanlarının Tesbiti ve İlaçlı Mücadele İmkânları Üzerinde Araştırmalar. Bit. Kor. Bült., 10 (1): 53–71.
- BRADEEN, J.M., and SIMON; P.W., 1998. Conversion of an AFLP Fragment Linked to the Carrot Y2 Locus to a Simple, Codominant PCR-Based Marker Form. Theor. Appl. Genetics, 97: 960–967.
- BRADEEN, J.M., STAUB, J.E., WYE, C., ANTONISE, R., PELEMAN, J., 2000. Towards an Expanded and Integrated Linkage Map of Cucumber (*Cucumis sativus* L.). Genome, 44: 111–119.
- BROWN, C.R., YANG, C.P., MOJTAHEDI, H., SANTO, G., AND MASUELLİ, R., 1996. RFLP Analysis of Resistance to Columbia Root-Knot Nematode Derived from *Solanum bulbocastanum* in a BC₂ population. Theor. Appl. Genet., 92: 572–576.
- BUDAK, H., SHEARMAN, R.C, PARMAKSIZ, I., GAUSSOIN, R.E., RIORDAN, T.P., and DWEIKAT, I. 2004. Molecular Characterization of Buffalogross Germplasm Using Sequence-Related Amplified Polymorphism Markers. Theor. Appl. Genet., 108: 328–334.
- BUROW, M.D., SIMPSON, C.E., PATTERSON, A.H., and STARR, J.L., 1996. Identification of Peanut (*Arachis hypogea* L.) RAPD Markers Diagnostic of Root-Knot Nematode (*Meloidogyne arenaria* Chitwood) Resistance. Molecular Breeding, 2: 369–379.
- CAI, H.W., GAO, Z.S., YUYAMA, N., and OGAWA, N., 2003. Identification of AFLP Markers Closely Linked to the *rhm* Gene for Resistance to Southern Corn Leaf Blight in Maize by Using Bulk Segregant Analysis. Mol. Gen. Genomics, 269: 299–303.
- CHEN, C.X., WANG, Z.L., YANG, D.E., YE, C.J., ZHAO, Y.B., JIN, D.M., WENG, M.L., and WANG, B., 2004. Molecular Tagging and Genetic Mapping of the Disease Resistance Gene *RppQ* to Southern Corn Rust. Theor. Appl. Genet., 108: 945–950.

- COOK, R., and EVANS, K., 1987: Resistance and Tolerance. In: Kerry, B.R., Brown, R. H., (ed). Principles and Practice of Nematode Control in Crop. Academic Press, Australia, pp: 179–220.
- DANIN-POLEG, 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.
- DANIN-POLEG, Y., REIS, N., TZURI, G., and KATZIR, N., 2001. Development and Characterization of Microsatellite Markers in *Cucumis*. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 61-72.
- DECKER, H., and FRITZSCHE, R., 1991. Resistenz von kulturpflanzen gegen Nematoden. Akademie-Verlag-Berlin, 340 s.
- DIJKHUIZEN, A., KENNARD, W.C., HAVEY, M.J. and STAUB, . J.E., 1996. RFLP Variation and Genetic Relationships in Cultivar Cucumber. *Euphytica*, 90: 79–87.
- DJIAN-CAPORALINO, C., PIJAROWSKI, L., JANUEL, A., ABAD, P., LEFEBVRE, V., PHALY, T., and PALLOIX, A., 1997. Caracterisation et Marquage de gene Me3 Porte Par la Lignee PM687 de *Capsicum annuum* L. Conferant la Resistance Aux Nematodes a Galles du Genre *Meloidogyne*. Compte-Rendu Final de l'AIP Genes de Resistance Aux Maladies, 26–28 Mars 1997, L'Isle Sur la Sorgue, France.
- DİKER, T. 1959. Nebat Parazit Nematodları. Türk. Şek. Fab. Neşr. No:70, Mars T. ve S.A.Ş. Matbaası, Ankara, 98 s.
- DUSSLE, C.M., QUINT, M., XU, M.L., MELCHINGER, A.E., and LUBBERSTEDT. T., 2002. Conversion of AFLP Fragments Tightly Linked to SCMV Resistance Genes *Scmv1* and *Scmv2* into Simple PCR-Based Markers. *Theor. Appl. Genet.*, 105:1190-1195.
- EISENBACK, J.D., HIRSCHMANN, H. and TRIANTAPHYLLOU, A.C., 1980. Morphologic Comparison of *Meloidogyne* Female Head Structures, Perineal Patterns and Stylets. *Journal of Nematology*, 12: 300–313.

- ELEKÇİOĞLU, İ. H., ve UYGUN, N., 1994. Occurrence and Distribution of Plant Parasitic Nematodes in Cash Crop in Eastern Mediterranean Region of Turkey. Proc. of Phytopathological Union, Kuşadası, Aydın, Türkiye, 409-410 s.
- ELEKÇİOĞLU, İ. H., OHNESORGE, B., LUNG, G., and UYGUN, N., 1994. Plant Parasitic Nematodes in The Mediterranean Region of Turkey. Nematol. Medit., 22: 59-63.
- ENNELİ, S., 1980. İç Anadolu Bölgesinde Yetiştirilen Domateslerde Zararlı Kök Ur Nematodu (*Meloidogyne incognita* Chitwood)'un Tanımı, Biyolojisi, Histopatolojisi ve Patojenitesi Üzerinde Araştırmalar. A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi (Basılmamış), Ankara, 129 s.
- ERTÜRK, H., ve ÖZKUT, S. 1973. Ege Bölgesi Şartlarında Kök-Ur Nematodlarına Dayanıklı Asma Anacı Araştırılması. IV. Bilim Kongresi, 5-8 Kasım, Ankara.
- ERTÜRK, H., ÖZKUT, S., BORAZANCI, HEKİMOĞLU, G., ve ARINÇ, Y. 1975. Bitki Zararlısı Nematodların Pamuk Solgunluk Etmenleri İle İlişkileri ve Korunma Yolları. Bit. Kor. Bült., 15 (2): 69-96.
- EVANS, K.M., and JAMES, C.M., 2003. Identification of SCAR Markers Linked to Pl-w Mildew Resistance in Apple. Theor. Appl. Genet., 106: 1178-1183.
- FASSULIOTIS, G., 1979. Plant Breeding for Root-Knot Nematode Resistance, p.425-453. In: J.N. Sasser and C.C. Carter (eds.). Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* species): Systematics, Biology and Control. Academic Press, New York.
- FAZIO, G., STAUB, J.E., and STEVENS, M.R., 2003. Genetic Mapping and QTL Analysis of Horticultural Traits in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Using Recombinant Inbred Lines. Theor. Appl. Genet., 107: 864-874.
- FERRIOL, M., PICO, B., and NUEZ, F., 2003. Genetic Diversity of a Germplasm Collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP Markers. Theor. Appl. Genet., 107: 271-282.
- FOLKERSTMA, R.T., ROUPPE VAN DER VOORT, J.N.A.M., DE GROOT, K.E., VAN ZANDVOORT, P.M., SCHOTS, A., GOMMERS, F.J., HELDER, J.,

- and BAKKER, J., 1996. Gene Pool Similarities of Potato Cyst Nematode Populations Assessed by AFLP Analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9 (1): 47–54.
- FAO, 2005. www.fao.org.
- GARCIA, G.M., STALKER, H.T., SHROEDER, E., and KOCHERT, G., 1996. Identification of RAPD, SCAR and RFLP Markers Tightly Linked to Nematode Resistance Genes Introgressed from *Arachis cardenasii* into *Arachis hypogea*. *Genome* 39: 836–845.
- GHEYSEN, G., VAN DER EYCKEN, W., BARTHELIS, N., KARIMI, M., and VAN MONTAGU, M., 1996. The Exploitation of Nematode-Responsive Plant Genes in Novel Nematode Control Methods. *Pestic. Sci.*, 47: 95-101.
- GÜRDEMİR, E., ve AĞDACI, M., 1975. Güney Anadolu Bölgesi Sebze Seralarında Zarar Yapan Kök-Ur Nematodları (*Meloidogyne* spp.) Üzerinde Sürvey Çalışmaları. *Bit. Kor. Bült.* 15 (3): 176–181.
- HADISOEGANDA, W.W., and SASSER, J.N., 1982. Resistance of Tomato, Bean, Southern Pea, and Garden Pea Cultivars to Root-knot Nematodes Based on Host Suitability. *Plant Disease*, 66: 145–150.
- HARTL, L., and SEEFELDER, S., 1998. Diversity of Selected Hop Cultivars Detected By Fluorescent AFLP. *Theor. Appl. Genet.*, 96: 112–116.
- HEKİMOĞLU, G. 1975. İzmir ve Çevresi Solanaceae Familyasına Ait Önemli Bitki Türlerinde Kök ur Nematodlarının (*Meloidogyne* spp.) (Nematoda: Heteroderidae) tanınmaları, Zararı ve Populasyon Yoğunlukları Üzerinde Araştırmalar. Böl Zir. Müc. Araş. Enst., Bornova, İzmir, 113 s.
- HONGTRAKUL, V., HUESTIS, G.M, and KNAPP, S.J., 1997. Amplified Fragment Length Polymorphisms as Tool for DNA Fingerprinting Sunflower Germplasm: Genetic Diversity Among Oilseed Inbred Lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 400–407.
- HOREJSI, T., and STAUB, J.E., 1999. Genetic Variation in Cucumber (*Cucumis sativus* L) as Assessed by Random Amplified Polymorphic DNA. *Genet. Res. Crop Evol.*, 46: 337–350.

- HOREJSI, T., BOX, J.M, and STAUB, J.E., 1999. Efficiency of Randomly Amplified Polymorphic DNA to Sequence Characterized Amplified Region Marker Conversion and their Comparative Polymerase Chain Reaction Sensitivity in Cucumber. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 124 (2): 128–135.
- HOREJSI, T., STAUB, J.E., and THOMAS, C., 2000. Linkage of Random Amplified Polymorphic DNA Markers to Downy Mildew Resistance in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Euphytica*, 115: 105-113.
- JOHNSON, A.V., and FASSULIOTIS, G., 1984. Nematode Parasites of Vegetable Crops. In: Nickle, W.R. (ed.). *Plant and Insect Nematodes*. Marcel Dekker Inc., New York and Basel, 323-372 s.
- JONG, D.W., FORSYTH, A., LEISTER, D., GEBHART, C., and BAULCOMBE, D.C. 1997. A Potato Hypersensitive Resistance Gene Against Potato Virus X Maps to a Resistance Gene Cluster on Chromosome 5. *Theor. Appl. Genet.*, 95: 246-252.
- 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.
- KENNARD, W.C., POETTER, K., DIJKHUIZEN, A., MEGLIC, V., STAUB, J.E., and HAVEY, M.J., 1994. Linkage Among RFLP, RAPD, Isozyme, Disease-Resistance, and Morphological Markers in Narrow and Wide Crosses of Cucumber. *Theor. Appl. Genet.*, 89: 42-48.
- KESSELI, R.V., PARAN, I., and MICHELMORE, R.W., 1994. Analysis of a Detailed Genetic Linkage Map of *Lactuca sativa* (lettuce) Constructed From RFLP and RAPD Markers. *Genetic*, 138: 1435-1446.
- KNERR, L.D., STAUB, J.E., HOLDER, D.J., and MAY, B.P., 1989. Genetic Diversity in *Cucumis sativus* L. Assessed by Variation at 18 Allozyme Coding Loci. *Theor. Appl. Genet.*, 78:119-128.
- KONIECZNY, A., and AUSUBEL, F.M. 1993. A Procedure for Mapping Arabidopsis Mutations Using Codominant Ecotype-specific PCR-based Markers. *Plant Journal*, 4: 403-410.

- KOSAMBI, D.D, 1944. The Estimation of Map Distances from Recombination Values. *Ann Eugen* 12: 172–175.
- LANDER, E.S., GREEN, P., ABRAHAMSON, J., BARLOW, A., DALY, M.J., LINCOLN, S.E., and NEWBURG, L. 1987. An Interactive Computer Package for Constructing Primary Genetic Linkage Maps of Experimental and Natural Populations. *Genetics* 1: 174–181.
- LEE, M. 1995. DNA Markers and Plant Breeding Programs. *Adv. Argon.* 55: 265–344.
- 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.
- LIN, J-J., KUO, J., MA, J., SAUNDERS, J.A., BEARD, H.S., MACDONALD, M.H., KENWORTHY, W., UDE, G.N., and MATTHEWS, B.F., 1996. Identification of Molecular Markers in Soybean Comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA Mapping Techniques. *Plant Molecular Biology Reporter*, 14 (2): 156–169.
- LU, Z-X., SOSINSKI, B., REIGHARD, G.L., BAIRD, W.V., ABBOTT, A.G., 1998. Construction of a Genetic Linkage Map and Identification of AFLP Markers for Resistance to Root-Knot Nematodes in Peach Root-Stocks. *Genome*, 41: 199–208.
- LU, Z-X., SOSEY-ALAONI, K., REIGHARD, G.L., BAIRD, WM.V., and ABBOTT, A.G., 1999. Development and Characterization of a Codominant Marker Linked to Root-Knot Nematode Resistance, and Its Application to Peach Rootstock Breeding. *Theor. Appl. Genet.*, 99: 115-122.
- MARTIN, G.B., WILLIAMS, J.G.K., and TANKSLEY, S.D., 1991. Rapid Identification of Markers Linked to a *Pseudomonas* Resistance Gene in Tomato by Using Random Primers and Near-Isogenic Lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 2336–2340.
- MAUGHAN, P.J., SAGHAI MAROOF, M.A., BUSS, G.R. and HUESTIS, G.M., 1996. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) in Soybean: Species

- Diversity, Inheritance, and Near-Isogenic Line Analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 93: 392–401.
- MEGLIC, V., and STAUB, J.E., 1996a. Inheritance and Linkage Relationships of Isozyme and Morphological Loci in Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 92:865-872.
- MEGLIC, V., and STAUB, J.E., 1996b. Genetic Diversity in Cucumber (*Cucumis sativus* L.): II. An Evaluation of Selected Cultivars Released Between 1846–1978. *Genet. Res. Crop Evol.*, 43:547-558.
- MEGLIC, V., SERQUEN, F., and STAUB, J.E., 1996 . Genetic Diversity in Cucumber (*Cucumis sativus* L.): I. An reevaluation of the U.S. Germplasm Collection, *Genet. Res. Crop Evol.*, 43: 533-546.
- MEKSEM, K., RUBEN, E., HYTEN, D., and TRIWITAYAKORN, K., 2001. Conversion of AFLP Bands into High-Throughput DNA Markers. *Mol. Gene. Genet.*, 265: 207–214.
- MENNAN, S., ECEVİT, O., 1996. Bafra ve Çarşamba Ovaları Yazlık Sebze Ekim Alanlarındaki Kök ır Nematodları (*Meloidogyne* spp.)’ nın Biyolojisi, Yayılışı ve Bulaşık Oranları Üzerine Araştırmalar. Türkiye III. Entomoloji Kongresi Bildirileri, 700–705.
- MENNAN, S., ve ECEVİT, O., 2001. Bafra ve Çarşamba Ovaları’ndan Elde Edilen Bazı *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) (Nemata: Heteroderidae) Populasyonlarında Irk Tespiti. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 25 (1): 33–39
- MIAN ROUF, A., WANG, T., PHILLIPS, D.V., ALVERNAZ, J., and BOERMA H.R. 1999. Molecular Mapping of the *Rcs3* Gene for Resistance to Frog-eye Leaf Spot in Soybean. *Crop Science*, 39: 1687–1691.
- MICHELMORE, R.W., PARAN, I., and KESSELI, R.V., 1991. Identification of Markers Linked to Disease-Resistance Genes by Bulk Segregant Analysis: A Rapid Method to Detect Markers in Specific Genomic Regions by Using Segregating Populations. *Prac. Natl. Acad. Sci.*, 88: 9828-9832.
- MILLIGAN, S.B., BODEAU, J., YAGHOBI, J., KALOSHIAN, I., and ZABEL, P., 1998. The Root-Knot Resistance Gene *Mi* from Tomato is a Member of

the Leucine Zipper, Nucleotide Binding, Leucine-Rich Repeat Family of Plant Genes. *Plant Cell*, 10: 1307–1321.

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.

NEGI, M.S., DEVIC, M., DELSENY, M., and LAKSHMIKUMARAN, M., 2000. Identification of AFLP Fragments Linked to Seed Coat Color in *Brassica juncea* and Conversion to SCAR Marker for Rapid Selection. *Theor. Appl. Genet.*, 101: 146–152.

NETSCHER, C., and SIKORA, R.A., 1990. Nematode Parasites on Vegetables. In: Luc, M., Sikora, R.A., Bridge, J. (eds). *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. CAB International, s 231-283.

NI, J., COLOWIT, P.M., OSTER, J.J., XU, K., and MACKILL, D.J., 2001. Molecular Markers Linked to Stem Rot Resistance in Rice. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 511–516.

OHMORI, T., MURATA, M., and MOTOYOSHI, F., 1996 Molecular Characterization of RAPD and SCAR markers Linked to the Tm-1 Locus of Tomato. *Theor. Appl. Genet.*, 92: 151–156.

ÖZTÜZÜN, N. 1970. Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi Kültür Bitkilerine Arız Olan Bitki Paraziti Nematodları Üzerinde Sürvey Çalışmaları. *Bit. Kor. Bült.* 10 (3): 180–197.

PARAN, I., and MICHELMORE, R.W. 1993. Development of Reliable PCR-Based Markers Linked to Downy Mildew Resistance Genes in Lettuce. *Theor. Appl. Genet.*, 85: 985-993.

PEHLİVAN, E., ve KAŞKAVALCI, 1993. Sanayi Domates Üretim Alanlarında Kökür Nematodlarının (*Meloidogyne* spp) Yayılışı ve Bulaşıklık Oranı Üzerinde Araştırmalar. SANDOM Çalışma Raporu, No: 6: 61–68.

PIERRA, M., BALLVORA, A., NOEL, L., VEUSKENS, J., and BONAS, U. 1997. Vers l'isolement Du Gene de Resistance Bs3 Du Piment, Compte-Rendu Final de l'AIP Genes de resistance Aux Maladies, 26-28 Mars, 1997, L'Isle Sur la Sorgue, France. Pp. 1–5.

- QUEDRAOGO, J.T., MAHESHWARI, V., BERNER, D.K., ST-PIERRE, C.-A., BELZILE, F., and TIMKO, M.P., 2001. Identification of AFLP Markers Linked to Resistance of Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) to Parasitism by *Striga gesnerioides*. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 1029-1036.
- RAFALSKI, J.A., and TINGEY, S.V. 1993. Genetic Diagnosis in Plant Breeding: RAPDs, Microsatellites and Machines. *Trends Genet.*, 9: 275-280.
- REAMON-BUTTNER, S.M., JUNG, C., 2000. AFLP-Derived STS Markers for the Identification of Sex in *Asparagus officinalis* L. *Theor. Appl. Genet.*, 100: 432-438.
- RIDOUT, C.J., DONINI, P., 1999. Use of AFLP in Cereals Research. *Trends in Plant Science*, 4 (2): 76–79.
- ROBERTS, P.A., 1992. Current Status of the Availability, Development, and Use of Host Plant Resistance to Nematodes. *Journal of Nematology* 24 (2): 213–227.
- ROUPPE VAN DER VOORT, J., WOLTERS, P., FOLKERTSMA, R., HUTTEN, R., VAN ZANDVOORT, P., VINKE, H., KANYUKA, K., BENDAHDANE, A., JACOBSEN, E., JANSSEN, R., and BAKKER, J. 1997. Mapping of the Cyst Nematode Resistance Locus Gpa2 in Potato Using a Strategy Based on Comigrating AFLP Markers. *Theor. Appl. Genet.*, 95: 874-880.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., and MANIATIS, T., 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2 nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SEMBLAT, J.P., WAJNBERG, E., DALMASSO, A., ABAD, P., and CASTAGNONE-SERENO, P., 1998. High-Resolution DNA Fingerprinting of Parthenogenetic Root-Knot Nematodes Using AFLP analysis. *Molecular Ecology*, 7: 119–125.
- SARDESAI, N., KUMAR, A., RAJYASHRI, K.R., NAIR, S., and MOHAN, M., 2002. Identification and Mapping of an AFLP Marker Linked to Gm7, a Gall Midge Resistance Gene and its Conversion to a SCAR Marker for its Utility in Marker Aided Selection in Rice. *Theor. Appl. Genet.*, 105:691-698.

- SASSER, J.N., 1979. Economic Importance of *Meloidogyne* in Tropical Contries. In: Lamberti, F., Taylor, C.E. (ed). Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.) Systematics, Biology and Control. Academic Pres, London-New York-San Francisco, 359-374 s.
- SASSER, J.N, EISENBACK, J.D., CARTER, C.C., and TRIANTAPHYLLOU, A.C., 1983. The International *Meloidogyne* Project-Its Goal and Accomplishments. Annu. Rev. Phytopathology, 21: 271–288.
- SASSER, J.N., and CARTER., C.C., 1985. Overview of The Internatioanal Meloidogyne Project, 1974-1984. In: Sasser, J.N., Carter, C.C. (eds). An Advanced Treatise on *Meloidogyne*: Volume 1, Biology and Control. North Carolina State University Grafics, s 19-24.
- SEMBLAT., J.P., WAJNBERG, E., DALMASSO, A., ABAD, P., and CASTAGNONE-SERENO, P., 1998. High-Resolution DNA Fingerprinting of Parthenogenetic Root-Knot Nematodes Using AFLP analysis. Molecular Ecology, 7: 119–125.
- SERQUEN, F.C., BACHER, J., and STAUB, J.E. 1997. Mapping and QTL Analysis of Horticultural Traits in a Narrow Cross in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Using Ranom Amplified Polymorphic DNA Markers. Moleculer Breeding, 3: 257–258.
- SHAN, X., BLAKE, T.K., and TALBERT, L.E., 1999. Conversion of AFLP Markers to Sequence-Spesific PCR Markers in Barley and Wheat. Theor. Appl. Genet., 98: 1072-1078.
- SIDDIQI, M.R., 2000. Tylenchida Parasites of Plants and Insects. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, UK. 2 nd. Editon, 805 s.
- SIJMONS, P.C., ATKINSON, H.J., and WYSS, U., 1994. Parasitic Strategies of Root Nematodes and Associated Host Cell Responses. Annu. Rev. Phytopathol. 32: 235–259.
- SHAN, X., BLAKE, T.K., and TALBERT, L.E., 1999. Conversion of AFLP Markers to Sequence-Spesific PCR Markers in Barley and Wheat. Theor. Appl. Genet., 98: 1072-1078.

- SÖĞÜT, M.A., ve ELEKÇİOĞLU, İ.H., 2000. Akdeniz Bölgesi'nde Sebze Alanlarında Bulunan *Meloidogyne* Goeldi, 1892 (Nemata:Heteroderidae) Türlerinin Irklarının Belirlenmesi. Türkiye Entomoloji Dergisi, 24 (1) : 33-40.
- STAUB, J.E., and MEGLIC, V., 1993. Molecular Genetic Markers and Their Legal Relevance for Cultigen Discrimination. A Case Study in Cucumber. HortTechnology, 3: 291–300.
- STAUB, J.E., BACHER, J., and POETTER, K., 1996a. Sources of Potential Errors in the Application of Random Amplified Polymorphic DNAs in cucumber. HortScience 31: 262–266.
- STAUB, J.E., GABERT, A., and WEHNER, C., 1996b. Plant Variety Protection: a Consideration of Genetic Relationships. HortScience, 31: 1086–1091.
- STAUB, J.E., SERQUEN, F., and GUPTA, M., 1996c. Genetic Markers, Map Construction, and Their Application in Plant Breeding. HortScience, 31: 729–741.
- STAUB, J.E., BOX, J., MEGLIC,V., HOREJSI, T.F., and MCCREIGHT, J.D., 1997a. Comparison of Isozyme and Random Amplified Polymorphic DNA Data for Determining Intraspecific Variation in *Cucumis*. Genet. Res. Crop Evol., 44: 257-269.
- STAUB, J.E., SERQUEN, F., MCCREIGHT, J.D., 1997b. Genetic Diversity in Cucumber (*Cucumis sativus* L): III. An Evaluation of Indian Germplasm. Genet. Res. Crop Evol., 44: 315-326.
- TAMULONIS, J:P., LUZZI, B.M., HUSSEY, R.S., PARROTT,W.A., and BOERMA, H.R. 1997a. DNA Marker Analysis of Loci Conferring Resistance to Peanut Root-Knot Nematode in Soybean. Theor. Appl. Genet., 95: 664–670.
- TAMULONIS, J:P., LUZZI, B.M., HUSSEY, R.S., PARROTT,W.A., and BOERMA, H.R. 1997b. DNA Markers Associated with Resistance to Javanese Root-Knot Nematode in Soybean. Crop Science 37: 783–788.
- TULLU, A., BUCHWALDT, L., WARKENTIN, T., TARAN, B., and VANDENBERG, A., 2003. Genetics of Resistance to Anthracnose and

- Identification of AFLP and RAPD Markers Linked to the Resistance Gene in PI 320937 Germplasm of Lentil (*Lens culinaris* Medikus). Theor. Appl. Genet., 106: 428-434.
- TYTGAT, T., MEUTTER, J.D., GHEYSEN, G., and COOMANS, A., 2000. Sedentary Endoparasitic Nematodes as a Model for Other Plant Parasitic Nematodes. Nematology, 2 (1): 113–121.
- TZORTZAKAKIS, E.A., BLOK, V.C., PHILLIPS, M.S. and TRUDGILL, D.L., 1999. Variation in Root-Knot Nematode (*Meloidogyne* spp.) in Crete in Relation to Control with Resistant Tomato and Pepper. Nematology, 1 (5): 499–506.
- UKOSKIT, K., THOMPSON, P.G., WATSON, C.E, LAWRENCE, G.W. 1997. Identifying a Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Marker Linked to a Gen for Root-Knot Nematode Resistance in Sweet Potato. Journal of the American Society for Horticultural Science, 122: 818–821.
- VAN DER VOORT, J.P., WOLTERS, P., FOLKERTSMA, R., HUTTEN, R., VAN ZANDVOORT, P., VINKE, H., KANYUKA, K., BENDAHDANE, A., JACOBSEN, E., JANSSEN, R., and BAKKER, J., 1997. Mapping of the the cyst nematode resistance locus *Gpa2* in potato using a strategy based on comigrating AFLP markers. Theor. Appl. Genet., 95:874-880.
- VON MALEK, B. WEBER, W.E., and DEBENER, T., 2000. Identification of Molecular Markers Linked to *Rdr1*, a Gene Conferring Resistance to Blackspot in Roses. Theor. Appl. Genet., 101: 977-983.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M., and ZABEAU, M., 1995. AFLP: A New Technique for DNA Fingerprinting. Nucleic Acids Research, 23 (21): 4407–4414.
- VRAIN, T.C. 1999. Engineering Natural and Synthetic Resistance for Nematode Management. Journal of Nematology 31 (4): 424–436.
- WALTERS, S.A., WEHNER, T.C., and BARKER, K.R., 1992. Effects of Root Decay on the Relationship Between *Meloidogyne* spp. Gall Index and Egg

- Mass Number in Cucumber and Horned Cucumber. Supplement to Journal of Nematology 24 (4S): 707–711.
- WALTERS, S.A., WEHNER, T.C., and BARKER, K.R., 1993. Root Knot Nematode Resistance in Cucumber and Horned Cucumber. HortScience, 28 (2): 151–154.
- WALTERS, S.A., WEHNER, T.C., and BARKER, K.R., 1996. NC-42 and NC-43: Root-Knot Nematode-Resistant Cucumber Germplasm. HortScience, 31 (7): 1246–1247.
- WALTERS, S.A., and WEHNER, T.C., 1997. Lucia, Manteo, and Shelby Root-knot Nematode-Resistant Cucumber Inbred Lines. HortScience, 32 (7): 1301–1303.
- WALTERS, S.A., WEHNER, T.C., and BARKER, K.R., 1997. A Single Recessive Gene for Resistance to the Root-Knot Nematode (*Meloidogyne javanica*) in *Cucumis sativus* var. *hardwickii*. The Journal of Heredity, 88 (1): 66–69.
- WALTERS, S.A., and WEHNER, T.C., 1998. Independence of the *mj* Nematode Resistance Gene from 17 Gene in Cucumber. HortScience, 33 (6): 1056–1052.
- WALTERS, S.A., WEHNER, T.C., and BARKER, K.R., 1999. Greenhouse and Field Resistance in Cucumber to Root-knot Nematodes. Nematology 1 (3): 279–284.
- WAUGH, R., and POWELL, W., 1992., Using RAPD Markers for Crop Improvement. Trends Biotech., 10: 186-191.
- WEHNER, T.C., WALTERS, S.A., and BARKER, K.R., 1991. Resistance to Root-Knot Nematodes in Cucumber and Horned Cucumber. Supplement to Journal of Nematology, 23 (4S): 611–614.
- WEILAND, J.J., and YU, M.H., 2003. A Cleaved Amplified Polymorphich Sequence (CAPS) Marker Associated with Root-Knot Nematode Resistance in Sugarbeet. Crop. Sci., 43: 1814–1818.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., and TINGEY, S.V. 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. Nucleic Acids Research, 18 (22): 6531–6535.

- 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.
- WILLIAMS, K.J., TAYLOR, S.P., BOGACKI, P., PALLOTTA, M., BARIANA, H.S., and WALLWORK, H., 2002. Mapping of the Root Lesion Nematode (*Pratylenchus neglectus*) Resistance Gene *Rlnn1* in Wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 104: 874–879.
- WU, K.S., and TANKSLEY, S.D. 1993. Abundance, Polymorphism and Genetic Mapping of Microsatellites in Rice. *Mol Gen Genet* 241: 225–235.
- XU, M.L., and KORBAN, S.S., 2000. Saturation Mapping of the Apple Scab Resistance Gene *Vf* Using AFLP Markers. *Theor. Appl. Genet.*, 101: 844–851.
- XU, J., NARABU, T., MIZUKUBO, T., and HIBI, T., 2000. A Molecular Marker Correlated with Selected Virulence Against the Tomato Resistance Gene *Mi* in *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, and *M. arenaria*. *Phytopathology*, 91: 377–382.
- XU, M.L., HUARACHA, E., and KOBAN, S.S., 2001. Development of Sequence-Characterized Amplified Regions (SCARs) from Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Markers Tightly Linked to the *Vf* gene in Apple. *Genome* 44: 63–70
- YAGHOUBI, J., KALOSHIAN, I., WEN, Y., and WILLIAMSON, V.M., 1995. Mapping a New Nematode Resistance Locus in *Lycopersicon peruvianum*. *Theor. Appl. Genet.*, 91: 457–464.
- YI, H.Y., RUFTY, R.C., and WERNSMAN, 1998. Mapping the Root-Knot Nematode Resistance Gene (*Rk*) in Tobacco with RAPD Markers. *Plant Disease*, 82: 1319–1322.
- YOUNG, L.D., 1992. Problems and strategies Associated with Long-term Use of Nematode Resistant Cultivars. *Journal of Nematology*, 24 (2): 228–233.
- YOUNG, N.D. 1999. A Cautiously Optimistic Vision for Marker-Assisted Breeding. *Mol. Breed.*, 5: 505–510.

YÜKSEL, H., 1974. Kök ur Nematodlarının (*Meloidogyne* spp.) Türkiye'deki Durumu ve Bunların Populasyon Problemleri Üzerine Düşünceler. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 5 (1): 83–105.

ÖZGEÇMİŞ

Zübeyir Devran, 1975 yılında Gümüşhane'nin Arzular Beldesi'nde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Gümüşhane'de, lise öğrenimini ise Trabzon'da tamamladı. 1992 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nden 1996 yılında Ziraat Mühendisi olarak mezun oldu. Şubat 1997 yılında aynı bölümde Yüksek Lisans öğrenimine başladı ve Kasım 1998 yılında bu bölümde açılan Araştırma Görevlisi kadrosuna atandı. Şubat -Mayıs 1999 tarihlerinde (3 ay) Horticulture Research International, Cell Physiology Department (İngiltere)'de "Moleküler Teknikler" konusunda çalışmalarda bulundu. "Antalya ve Çevresinde Kültür Bitkilerinde Zararlı Olan Beyazsinek Türlerinin (Homoptera: Aleyrodidae) AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) Tekniği Kullanılarak İncelenmesi" adlı yüksek lisans tez çalışmasını tamamlayarak Kasım 1999 yılında Ziraat Yüksek Mühendisi olarak mezun oldu. Kasım 2000 yılında Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne (Antalya) geçiş yaptı ve Enstitünün Bitki Koruma Bölümü'nde çalışmaya başladı. Şubat 2001 yılında Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nde Doktora öğrenimine başladı. 2001 (2 ay) ve 2002 (1 ay) yıllarında Horticulture Research International, Plant Biotechnology Department (İngiltere)'de "Kök-Ur Nematodlarının Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması, Tür İçi ve Türler Arası Genetik Çeşitliliğinin AFLP ile Belirlenmesi" çalışmalarını yürüttü. Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Yurt Dışı Araştırma Bursunu (NATO-A2) kazanarak 2004 yılında 6 ay süreyle Warwick University, Warwick Horticulture Research International (İngiltere)'de Doktora Tezinin bir bölümünü (AFLP, cloning ve sequencing) yürüttü. Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nün, Bitki Koruma Bölümü'nde Moleküler Biyoloji ve Nematoloji Laboratuvarlarında moleküler markırların bitki ıslahında ve nematolojide kullanılması konularında çalışmaktadır. Evli ve bir çocuk babasıdır.