



# **Biberde Kök-Uru Nematoduna Dayanıklılık Sağlayan N Geninin Haritalanması ve Moleküler Islahı**

**Program Kodu: 1001**

**Proje No: 1100675**

Proje Yürütücüsü:  
**Prof. Dr. Anne FRARY**

Araştırmacı(lar):

Yrd. Doç. Dr. Mehmet Ali Söğüt

Danışman(lar):

Prof. Dr. Sami DOĞANLAR

Bursiyer(ler):

Mehmet Enes ASLAN

Mehmet GÖKTAY

**MAYIS 2014  
İZMİR**



## ÖNSÖZ

Biber günlük diyetimizin önemli bir bileşenidir. Bu nedenle ülkemizde en çok yetiştirilen ve değişik şekillerde tüketilen sebze bitkileri arasında yer almaktadır. Ülkemiz biber üretim miktarı bakımından dünya da önemli bir yerdedir. Kök-uru nematodları biber tarımına ekonomik düzeylerde zararlar yapan, üretimini sınırlandıran ve hatta bazı yörelerde imkansız hale getiren en önemli bitki zararlıları arasında yer almaktadır. Kimyasal ilaçlama ya da çok pahalı bir işlem olan solarizasyon yapmaksızın özellikle sera koşullarında biber tarımını yapmak mümkün değildir. Bu nedenle, kök-uru nematodlarına dayanıklı çeşit kullanımı en başarılı strateji olarak görülmektedir. Günümüze kadar yürütülen klasik ıslah çalışmalarından başarılı sonuçlar elde edilememiştir. Halen kök-uru nematoduna dayanıklı bir çeşit bulunmamaktadır. Önerilen projede kök-uru nematodlarına dayanıklılık sağlayan genlerden birisi olan N geni üzerinde çalışılmıştır. Bu genin marköre dayalı ıslah çalışmaları ile istenilen çeşitlere aktarılması için gerekli olan bağlantılı moleküler markörler proje kapsamında belirlenmiştir. Bu proje TÜBİTAK tarafından Prof. Dr. Anne FRARY'ye sağlanan destekle tamamlanmıştır (TÜBİTAK 110O675).

## İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	4
ŞEKİL LİSTESİ	5
ÖZET	6
ABSTRACT	7
GİRİŞ	8
LİTERATÜRE ÖZETİ	11
GEREÇ VE YÖNTEM	15
1. Nematod Testlemeleri	15
1.1. <i>Meloidogyne incognita</i> ırk 2'nin üretilmesi	16
1.1.1. Bitkilerin yetiştirilmesi	16
1.1.2. Kök-Ur Nematodu İnokulasyonu ve Üretimi	16
1.2. Testleme Çalışmaları	16
1.2.1. Dayanıkları Gen Kaynaklarının <i>M. incognita</i> ırk 2 ile Testlenmesi	16
1.2.2. F <sub>1</sub> , F <sub>2</sub> ve F <sub>3</sub> Bitkilerinin <i>M. incognita</i> ırk 2 ile Testlenmesi	17
1.3. Nematod Testlemesi Sonuçlarının Analiz Edilmesi	17
2. Genetik Materyallerin Oluşturulması	17
3. Genetik Haritalama ve Moleküler İslah Çalışmaları	18
3.1. SSR ve COSII Markör Analizleri	19
3.2. SRAP Markör Analizleri	19
3.3. SNP Markörü Analizleri	20
3.4. SNP genotipleme için CAPS analiz yönteminin geliştirilmesi	20
3.4.1. CAPS analiz yöntemi	20
3.5. Data Analizleri	21
BULGULAR VE TARTIŞMA	21
1. Nematod Testlemesi	21
1.1. Nematod İnokulum Kaynaklarının Üretilmesi	21
1.2. Genetik Kaynakların KA1 ve G3 izolatları ile Testlenmesi	22
1.3. Dayanıkları Bulunan Hatlar ile yapılan Melezlenme çalışmaları	26
1.4. N geni için Yürütülen İslah Çalışmaları	29
1.5. F <sub>2</sub> popülasyonlarının Nematod ile testlenmesi	30
1.6. F <sub>3</sub> popülasyonlarının Nematod ile testlenmesi	33
2. Moleküler Genetik Analizler	40
2.1. Biber doku örneklerinden DNA izolasyonu sonuçları	40
2.2. Polimorfik SRAP Markörlerinin Belirlenmesi	45
2.3. F <sub>3</sub> popülasyonunda SNP2 ve N genine yakın markörlerin testlenmesi	53
2.4. SCAR N markörüne ait F <sub>3</sub> popülasyonundaki analiz sonuçları	54
2.5. F <sub>3</sub> popülasyonu fenotip ve genotip sonuçları	55
SONUÇLAR	60
EKLER	61
KAYNAKLAR	62

## **TABLO LİSTELERİ**

Tablo 1. Kök-ur nematodlarına karşı dayanıklılık sağlayan kaynaklar	12
Tablo 2. Çalışmada dayanıklı kaynak olarak kullanılan biber genotipleri	15
Tablo 3. İki izolat ile yapılan nematod testleme sonuçları	22
Tablo 4. Genetik materyallerin nematoda gösterdikleri tepkiler	23
Tablo 4A. Nematod testlemesine alınan biber genotipleri	25
Tablo 5. Nematod testleme sonuçları	26
Tablo 6. F2 popülasyonu Nematod testleme sonuçları	28
Tablo 7. F3 popülasyonu nematod testleme sonuçları	31
Tablo 8: Biber DNA'larının NanoDrop ölçümlerindeki konsantrasyonları	38
Tablo 9. Polimorfizm taramasından kullanılan primer listesi	39
Tablo 10. Biber dokuzuncu kromozomunda bulunan markörlerin listesi	41
Tablo 11. Polimorfik markör listeri	42
Tablo 12. F3 popülasyonuna ait fenotip bilgileri ve genotipleme sonuçları	54

## ŞEKİL LİSTELERİ

Şekil 1. Dayanıklı biber genotiplerine ait resimler	20
Şekil 2. AZN-1 biber çeşitine ait resim	21
Şekil 3A. KA1 izolatu ile yapılan testleme sonuçları histogramı	23
Şekil 3B. G3 izolatu ile yapılan testleme sonuçları histogramı	23
Şekil 4. Nematod testlemesi sonucu elde edilen kök resimleri	24
Şekil 5. AZN-1 ile yapılan melezleme resimleri	25
Şekil 6. Gal indeksinin birey sayısına dağılımını gösteren grafik	31
Şekil 7. Biber genotiplerinden izole edilen DNA'ların jel görüntüleri	38
Şekil 8. Elektroforez sistemi ile yapılan polimorfizm analizi sonuçları	42
Şekil 9. Polimorfik bulunan markörlerin kapillar elektroforez görüntüleri	43
Şekil 10. ScarN markörü kapillar elektroforez sonucu	43
Şekil 11. EM1 / EM2 SRAP primerlerinin ME1-14 SRAP primerleri ile kombinasyonu ile elde edilen SRAP markör profilleri	45
Şekil 12. EM3 / EM4 SRAP primerlerinin ME1-14 SRAP primerleri ile kombinasyonu ile elde edilen SRAP markör profilleri	46
Şekil 13. EM5 / EM6 SRAP primerlerinin ME1-14 SRAP primerleri ile kombinasyonu ile elde edilen SRAP markör profilleri	46
Şekil 14. EM11 / EM12 SRAP primerlerinin ME1-14 SRAP primerleri ile kombinasyonu ile elde edilen SRAP markör profilleri	47
Şekil 15. EM13 SRAP primerinin ME1-14 SRAP primerleri ile elde edilen SRAP markör profilleri	47
Şekil 16. EM14 / EM15 SRAP primerlerinin ME1-14 SRAP primerleri ile kombinasyonu ile elde edilen SRAP markör profilleri	48
Şekil 17. EM17 SRAP primerinin ME1-14 SRAP primerleri ile elde edilen SRAP markör profilleri	48
Şekil 18. AZN-1 ve CW genotiplerinin SNP1 CAPS profilleri	49
Şekil 19. AZN-1 ve CW genotiplerinin SNP2 CAPS profilleri	50
Şekil 20: N geni için oluşturulmuş moleküler genetik harita	51
Şekil 21: SNP 2 markörünün anaçlardaki genotip sonuçları	52
Şekil 22: SCAR N markörünün anaçlardaki genotip sonuçları	53
Şekil 23: SCAR N markörünün F3 popülasyonundaki analiz sonuçları	53
Şekil 24: SCAR PM6a markörünün F3 popülasyonundaki sonuçları	54

## ÖZET

Dünyada yılda yaklaşık 31 milyon ton biber üretilmektedir. Türkiye toplam 2.1 milyon ton yıllık biber üretimi ile Çin (16 milyon ton/yıl) ve Meksika (2.4 milyon ton/yıl)'dan sonra dünyanın en çok biber üreten 3. ülkesidir (FAO 2012). Akdeniz ve Ege Bölgeleri özellikle örtü-altı ve sera biber yetiştiriciliği bakımından en önemli bölgelerimizdir. Akdeniz kıyı şeridinde Antalya'nın Demre, Finike ve Kumluca ile İçel'in Kazanlı üretim sahalarında yoğun bir şekilde sera biber yetiştiriciliği yapılmaktadır. Toplam sera sebzeçiliği içinde biber yetiştiriciliğinin yapıldığı kısım yaklaşık %15'lik bir alanı kapsamaktadır. Bir çok biyotik ve abiyotik faktör biber yetiştirilen bölgelerimizde biber tarımını sınırlamakta, verim ve kaliteyi düşürmektedir. Kök-ur nematodları biyotik faktörler arasında yer alan en önemlilerinden birisidir ve ülkemizde biber yetiştirilen alanların en önemli zararlısıdır. Kök-ur nematodları bitki köklerinde irili ufaklı urlar oluşturmak suretiyle bitkinin kökleri vasıtasıyla topraktan su ve besin madde alınımını kısıtlamaktadır. Sonuç olarak, kök-uru nematod zararından dolayı bir çok bölgemizde biber yetiştiriciliği zarar görmektedir ve mevcut mücadele yöntemleri ile üretim maliyetleri artmaktadır. Nematodlarla kültürel mücadele yapmak mümkün görünsede özellikle örtü-altı yetiştiriciliği açısından pratik ve ekonomik olmaktan oldukça uzaktır. Nematod mücadelesinde tek yol biber yetiştirilecek toprakların solarizasyonu veya nematositlerin kullanılmasıdır. Her iki işlemde pahalı, yoğun emek isteyen ve çevre dostu olmayan yaklaşımlardır. Özellikle nematositlerin son derece toksik olmaları, sınırlı bir süre koruma sağlamaları ve kalıntı etkilerinden dolayı kullanımları sakıncalıdır. Geniş alanlarda yapılan çalışmalarında ise toprak solarizasyonu pratik değildir ve çok pahalıya mal olmaktadır. Dolayısıyla, nematod probleminin bulunduğu bölgelerimizde dayanıklı biber çeşitlerinin yetiştirilmesi belkide en kolay, pratik, ucuz ve çevre dostu yaklaşımdır. Ülkemizde yetiştirilen biber çeşitlerinin hiç biri doğal olarak kök-uru nematod dayanıklılığına sahip değildir. Ancak, kök-uru nematodlarına karşı dayanıklılığı birçok *Capsicum annum*'da belirlenmiştir ve bu dayanıklılık genlerinin bir çoğu değişik biber çeşitlerine aktarılmıştır. Ancak, dayanıklılık gen'lerinin aktarılması yoğun bir şekilde tarla ve sera koşullarında nematod testlemeleri gerektirdiği için zor bir işlemdir. Bu nedenle bu gen'lerin etkili bir şekilde ıslahı sınırlıdır. Önerilen bu projede biberde belirlenen kök-uru nematodlarına dayanıklılık sağlayan N geni ile bağlantılı olan moleküler markörler belirlenmiştir ve N geninin bağlantılı markör ile Türk biber çeşitlerine aktarılması işlemine başlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler** Biber, Kök-Uru Nematodları, Dayanıklılık, Moleküler Haritalama, Moleküler Islah

## ABSTRACT

Worldwide pepper production is approximately 31.0 milyon tons per year. Turkey is one of the most important countries in the world in terms of pepper production and area planted. Turkey ranks third in annual pepper production with 2.1 million tons produced while China, produces 16 million tons (FAO 2012). The Mediterranean and Aegean regions are the most important regions for pepper production especially in terms of growth under cover or in the greenhouse. Greenhouse peppers are intensively grown along the Mediterranean coast in Antalya's Demre, Finike and Kumluca regions and İçel's Kazanlı production area. Pepper accounts for approximately 15% of the total greenhouse vegetable production. Pepper yield, quality and growth are limited by many biotic and abiotic factors. Root knot nematode is one of the most important biotic factors affecting pepper production. Root-knot nematodes form root knots on the plants roots and limit the intake of water and nutrients from the soil. As a result, pepper growers in many regions suffer crop damages from nematodes and current control methods increase production costs. Cultural methods for the control of nematodes are possible however they are neither practical nor economical. The only alternatives are solarization of soil or the use of nematicides. Both methods are expensive, difficult, laborious and/or dangerous for the environment. Nematicides are extremely toxic, are only effective for a limited period and leave residues in the soil. In large production areas, solarization is not a practical solution and is also very expensive. Thus, increasing production costs. As a result, perhaps the easiest, most practical, cheapest and most environmentally friendly approach is the development of nematode resistant pepper cultivars. None of the current cultivars grown in Turkey have nematode resistance. However, many resistant *Capsicum annuum* accessions have been identified and genes for resistance (*N* and *Me* genes) have been transferred to cultivars. This is also a difficult task as plants must be tested for resistance under greenhouse or field conditions. For this reason, these resistance genes have been of limited use in breeding. In the proposed project, molecular markers linked to *N* gene were identified and, the progress to transfer *N* gene to Turkish pepper cultivars have been started by using linked markers

## Keywords

Pepper, Root-Knot Nematodes, Molecular Mapping, Molecular Breeding

## GİRİŞ

Kök-uru nematodları (*Meloidogyne* spp.) ülkemizde biber üretimini sınırlayan ve önemli düzeylerde ekonomik kayıplara sebep olan ve hatta bazı bölgelerimizde biber tarımını imkansız hale getiren en önemli bitki zararlıları arasında yer almaktadırlar. Günümüzde geliştirilen yeni biber çeşitlerinin ticari değerinin olması için birçok hastalık etmenlerine dayanıklılık sağlayan genlerden en az bir veya bir kaçına çoğu zaman da hepsine birden sahip olması gerekmektedir. Nematod dayanıklılığı günümüz biber çeşitlerinde mutlaka bulunması gereken bir karakterdir. Bazı önemli pazarlar için nematod dayanıklılığı tek başına bir ön şart haline gelmiştir. Bu nedenle, verimi ve kalitesi yüksek ve aynı zamanda kök-ur nematoduna dayanıklı olan yeni biber çeşitlerinin tohumluk piyasasında yer edinmesi çok kolay olacaktır. Dolayısıyla, yürütülen projede biberde kök-uru nematoduna dayanıklılık sağlayan *N* geninin biber genomundaki yerinin lokalize edilmesi sağlanmış ve genle bağlantılı olan moleküler markörler belirlenmiştir. Bu amacı gerçekleştirmek için projede öngörüldüğü gibi önceki çalışmalarda kök-uru nematoduna dayanıklı olduğu rapor edilen bazı gen kaynaklarının (*N* geni taşıyan) özellikle Türkiye’de problem olan *Meloidogyne incognita* ırk 2 ile test edilerek bu ırka da dayanıklılık sağladıkları belirlenmiştir. Patolojik testlemeler sonucunda dayanıklı bulunan gen kaynakları (Carolina Wonder ve Charleston Belle) proje ortağı Yüksel Tohumculuk Tarım San. Tic. Ltd. Şti. Firması tarafından sağlanan duyarlı çeşit (AZN-1) ile melezlenmiştir. Elde edilen F1 melezler tekrar nematod ile patolojik testlemelere alınmış ve testlemeler sonucunda dayanıklı oldukları doğrulanan bitkiler kendilenerek F2 ve AZN-1 çeşitine geriye melezlenerek BC1F1 generasyonları oluşturulmuştur. Haritalama ve markör belirleme çalışmalarında F2 populasyonları kullanılmıştır. Proje yürütülürken *N* geni Fransız ve Çinli iki grup tarafında biber genomunda 9. kromozomda haritalanmıştır. Bu nedenle, markör belirleme çalışmalarında 9. kromozom üzerinde yoğunlaşmıştır. Çalışmada 9. Kromozomda yer alan bütün SSR, COSII ve ayrıca proje kapsamında tarafımızca geliştirilmiş SNP markörleri kullanılmıştır. Önerilen proje sonucunda *N* genine çok sıkı bağlantılı olan SNP markörleri belirlenmiştir ve halen bu markörler *N* geninin marköre dayalı seleksiyon metodu ile AZN-1 çeşitine aktarılması işlemine başlanmıştır.



## LİTERATÜR ÖZETİ

Türkiye biber üretimi Türkiye istatistik kurumu verilerine göre 1987 yılında 250.000 ton iken 2008 yılında 2.1 tona ulaşmıştır (FAO 2012). Türkiye yıllardan beri kiraz, kayısı, kavun gibi meyvelerde Dünyada en önemli üretici olmasına rağmen, son on yılda sebze üretimi meyve üretimine kıyasla daha fazla gelişerek biber ve domates Türkiye'nin en önemli tarımsal ihraç ürünleri haline gelmiştir. Kök-ur nematodları kültür bitkilerinin köklerinde irili ufaklı ur (gal) oluşturmaları ile karakterize edilirler ve dünyada tarımsal alanlarda büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Günümüze kadar dünyada 80 türü tespit edilmiştir (Siddiqi 2000). Ancak, tropikal, subtropikal ve ılıman iklim bölgelerinde *Meloidogyne incognita* Chitwood, *M. javanica* Chitwood, *M. arenaria* Chitwood ve *M. hapla* Chitwood en yaygın ve ekonomik olarak en önemli Kök-ur nematodu türleridir (Johnson ve Fassuliotis 1984, Sasser ve Carter 1985, Netscher ve Sikora 1990). Konukçu ve nematod ilişkilerine bağlı olarak bu türlerin çok sayıda konukçu ırkları bulunmaktadır. Decker ve Fritzsche (1991) dünya genelinde *M. incognita*'nın 4, *M. javanica*'nın 2 ve *M. arenaria*'nın 2 konukçu ırkının olduğunu belirtmişlerdir. Kök-ur nematodları örtü altı sebze üretiminin yapıldığı tüm kıyı bölgelerimizde en önemli zararlılardan birisi durumundadır. *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. chitwoodi* ve *M. thamesi* ülkemizde tanımlanan kök-ur nematodu türleridir (Yüksel 1974, Pehlivan ve Kaşkavalcı 1993, Elekçioğlu ve Uygun 1994, Mennan ve Ecevit 1996, Kaşkavalcı ve Öncüler 1998, Özarslandan ve ark. 2007). Türkiye'de Kök-ur nematodlarının ırkları ile yapılan çalışmalarda Akdeniz Bölgesi'nde, Orta Karadeniz Bölgesi'nde ve Çanakkale ilinde *M. incognita* Irk 2'sinin ve *M. javanica* Irk 1'inin bulunduğu tespit edilmiştir (Söğüt ve Elekçioğlu 2000, Mennan ve Ecevit 2001, Gözel ve Güneş 2007, Devran ve Söğüt 2010). Birçok sebze türü kök-uru nematodlarının konukçuları arasında yer almaktadır. Sasser (1980) sebze üretiminde kök-ur nematodlarının domateste %29, patlıcanda %23 ve biber bitkisinde %12 verim kaybına neden olduklarını bildirmektedir. Antalya'da sebzelerde Kök-ur nematodlarının %16.7, Adana'da ise %47 oranında verim kayıplarına neden olduğu belirtilmektedir (Ağdacı 1978). Yapılan ırk çalışmalarında Türkiye'de *Meloidogyne javanica*'nın ırk 1'i yaygın olarak bulunmuştur. *Meloidogyne javanica*'nın bu ırkı *Capsicum annum* L. türünde beslenmediği için ekonomik olarak önemli değildir (Özarslandan ve Elekçioğlu 2003). Ancak, örtüaltı biber yetiştiriciliğinde *M. incognita* ve *M. arenaria* önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Söğüt ve Elekçioğlu (2007) Adana Kazanlı Bölgesinde *M. incognita* ile yoğun olarak bulaşık seralarda %80'e yakın verim kayıpları tespit etmişlerdir. Vito ve ark. (1985) *M. incognita*'nın toprakta 2.2 adet yumurta + L2

yoğunluğunda %58, 0.17 yoğunluğunda %20 ürün kaybı olabileceğini tespit etmişlerdir. Khan ve Khan (1991) farklı *C. annuum* çeşitlerinde *M. incognita*'nın üreme faktörünü 0.8 ile 16.3 arasında tespit etmiştir. Kök-ur nematodları özellikle sebzelere önemli zarar veren biyotik stresler faktörlerinden birisidir ve dünyada her yıl yaklaşık 125 milyon dolar değerinde ürün kayıplarına neden olmaktadır (Sasser ve Freckman 1987, Bird ve Kaloshian 2003, Chitwood 2003, Atkinson ve ark. 1995, Koenning ve ark. 1999). Kök-ur nematodları bitki köklerinden direk hücre özsuyu emerek beslenmelerinin yanında emgi sırasında enzimler salgılamakta ve kök hücre ve dokularında deformasyonlara neden olmaktadır. Ayrıca bitki köklerinde yaralar meydana getirerek bitkileri ikincil toprak kökenli patojenlere karşı duyarlılıklarını artırmaktadırlar. Köklerin ağır infeksiyonu sonucunda büyümede gerileme, yapraklarda sararma (chlorosis), köklerde urulanma ve bitkideki su ve besin maddelerinin iletiminde problemler olmakta ve sonuçta verimde büyük düşüşler meydana gelmektedir (Bird ve Kaloshian 2003). Nematodlarla mücadelede günümüzde yoğun olarak kimyasallar kullanılmaktadır. Ancak Metil bromid başta olmak üzere son yıllarda nematodlara karşı kullanılan nematisitlerin bir çoğu insan ve çevre sağlığına zararlı etkilerinden dolayı Avrupa ülkelerinde ve Amerika'da yasaklanmıştır (Broun ve Supkoff 1994, Sorribas ve ark. 2005). Türkiye'de de nematodlara ve toprak kökenli zararlılara karşı toprak fümigantı olarak kullanılan Metil bromid 2007 yılı sonunda yasaklanması hedeflenmiştir (Yücel ve ark. 2007). Nematodlara karşı yapılan kimyasal mücadelenin insan sağlığına ve çevreye olan olumsuz etkilerinden dolayı son yıllarda alternatif mücadele yöntemleri üzerine çok yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Ekim nöbeti kök-ur nematodlarının çok fazla konukçu dizisine sahip olmaları nedeniyle önerilmemektedir (Abad ve ark. 2003). Kök-ur nematodlarına karşı en önemli mücadele yöntemlerinden birisi dayanıklı çeşit kullanımıdır. Günümüzde özellikle domates yetiştiriciliğinde *M. incognita*, *M. javanica* ve *M. arenaria*'ya karşı dayanıklılık sağlayan ve *Mi* geni içeren ticari domates çeşitleri yoğun olarak kullanılmaktadır. Biber bitkilerinde de dayanıklılık sağlayan kaynaklar farklı çalışmalarda bildirilmektedir. Ancak henüz ticari olarak kullanımları yaygın değildir ve bu konudaki ıslah çalışmaları devam etmektedir. Kök-ur nematodlarıyla mücadelede doğal dayanıklılık genlerinin kullanılması tercih edilen bir yöntemdir (Williamson ve Kumar 2006). Bazı bitki türlerinde nematoda dayanıklılık kantitatif karakter lokusları ile (QTL) sağlanır; fakat bu genler tanımlanamamıştır (Dale ve Phillips 1982). Bazı bitkilerde ise dayanıklılık genleri tek bir dominant gen (*R* geni) tarafından sağlanmaktadır. Dayanıklılığı sağlayan *R* geni nematode daki *Avr* geni ile etkileşime girmekte ve sonuçta bitki savunma mekanizmasını tetiklenmektedir. Bitki savunma mekanizmasının

başlatılabilmesi için bitkide *R* geninin ve nematode da da *Avr* geninin bulunması gerekmektedir. Bu mekanizma Guard hipotezi olarak adlandırılmaktadır. Bu mekanizmada *Avr* proteini bitkide *R* proteinlerinden başka proteinleri hedefler, *R* proteinleri bitkideki patojen tarafından meydana getirilen proteinlerdeki değişimleri algılar ve çoğu zaman hipersensitif cevap olan (HR) bitki savunma makizmasını başlatır (Cabrera Poch ve ark. 2006). Bitkilerde *R* geni yoksa, *Avr* geninin hedef proteini algılanamaz ve hastalık oluşur. Kök-ur nematoduna dayanıklılık sağlayan genler daha çok yabancı bitki türlerinde bulunmaktadır (Roberts 1995). Bitkilerdeki doğal nematoda dayanıklılık genlerinin başka bitkilerde heterolog anlatımıyla (expresyonu) ilgili çalışmalar yapılmasına rağmen, başarılı sonuçlar alınamamıştır; örneğin *Globodera* cinsine ait dayanıklılık sağlayan *HeroA* geni, bu türe karşı duyarlı domatese aktarıldığında *Globodera*'ye karşı dayanıklılığını kaybettiği görülmüştür (Sobczak ve ark. 2005). Çeşitli bitkilerde (patates, biber ve domates) kök-ur nematodlarına dayanıklılık genlerinin (*H1*, *Me*, *N* ve *Mi-1* genleri) haritaları oluşturulmuş ve bazı genler klonlanmıştır. Çoğu tatlı biber (*Capsicum annuum*) çeşitleri *M. incognita* 'ya karşı oldukça hassastır (Taylor ve Sasser 1978). Ancak, nematod dayanıklılığı biber ıslah çalışmalarında son zamanlara kadar ilgi çekmemiştir. Biberde (*Capsicum annuum*) *N* ve *Me* gen'lerinin nematodlara karşı dayanıklılık sağladığı bildirilmektedir (Hare 1956) ve bu dayanıklılık genleri Mississippi Nemaheart biber çeşiti gibi bir çok kültür çeşitlerine aktarılmıştır (Hare 1957, Fery ve Dukes 1996). Ayrıca, Orta Amerika ve Hindistan orijinli iki adet acı *Capsicum annuum* çeşidinde (PM217 ve PM687) üç ana kök uru nematoduna karşı dayanıklılık belirlenmiştir (Hendy ve ark. 1983). Hendy ve ark. (1985) tarafından yapılan kalıtım belirleme çalışmalarında PM217 nolu hattın iki (*Me1* ve *Me2*), PM687 nolu hattın iki (*Me3* ve *Me4*) ve Yolo Wonder çeşidinden de bir (*Me5*) adet olmak üzere beş adet gen belirlemişlerdir. Günümüze kadar biberde altı tane kök uru nematodlarına dayanıklılık sağlayan gen (*Me1*, *Me3*, *Me4*, *Me5*, *Me6* ve *Me7*) tanımlanmıştır (Tablo 1) ve bu genlerin bir çok *Meloidogyne* türüne karşı dayanıklılığı kontrol ettiği belirtilmiştir (Djian-Caporalino ve ark. 2006). Bu genlerden *Me1*, *Me3* ve *Me4* genleri *M. incognita*, *M. arenaria* ve *M. javanica* türlerine karşı dayanıklılığı kontrol eden geniş spektrumlu genlerdir (Hendy ve ark. 1985, Djian-Caporalino ve ark. 1999). *N* Geni ise *M. incognita* ırk 1, ırk 2, ırk 3 ve ırk 4, *M. arenaria* ırk 1 ve ırk 2 ve *M. javanica* türlerine karşı dayanıklılık sağlamaktadır (Thies ve Ferry 2000). Thies ve Ariss (2009) tarafından yapılan son genetik çalışmalarda ise *N* ve *Me3* genleri arasındaki allelik ilişkiler belirlenmiştir. Bu çalışma sonuçlarına göre bu iki gen birbirinden farklı genler olup aynı genin farklı allelleri olmadığı ortaya konmuştur.

Tablo 1. Biberde Kök-ur nematoduna dayanıklı kaynaklar

Accession	Biber Türleri	Kök-ur Nematod Türü	Gen	Kaynak
Carolina Cayenne	<i>Capsicum annuum</i>	<i>M. incognita</i> , race 1, 2, 3, and 4	N	Zamora ve ark. 1994
Carolina Cayenne	<i>Capsicum annuum</i>	<i>M. incognita</i> , race 1, 2, 3, and 4	N	Thies ve ark. 1997
Carolina Cayenne	<i>Capsicum annuum</i>	<i>M. arenaria</i> race 1 and 2	N	Noe 1992
Charleston Hot	<i>Capsicum annuum</i>	<i>M. incognita</i> race 1, and 3	N + 1 recessive	Fery ve Dukes, 1997
Charleston Belle	<i>Capsicum annuum</i>	<i>M. arenaria</i> race 1 and 2, <i>M. javanica</i>	N	Thies ve ark. 2000
Carolina Wonder	<i>Capsicum annuum</i>	<i>M. arenaria</i> race 1 and 2, <i>M. javanica</i>	N	Thies ve ark. 2000
PA-353	<i>Capsicum chinense</i>	<i>M. incognita</i> race 3	N	Fery ve Thies 1997
PA-398	<i>Capsicum chinense</i>	<i>M. incognita</i> race 3	N	Fery ve Thies 1997
PA-426	<i>Capsicum chinense</i>	<i>M. incognita</i> race 3	N	Fery ve Thies 1997
PI 322719	<i>Capsicum annuum</i>	<i>M. javanica</i> , <i>M. incognita</i> , <i>M. arenaria</i>	Me3, Me4	Djian-Caporalino 2007
PI 201234	<i>Capsicum annuum</i>	<i>M. javanica</i> , <i>M. incognita</i> , <i>M. arenaria</i> , <i>M. chitwoodi</i>	Me1, Mech2	Djian-Caporalino 2007
CM334	<i>Capsicum annuum</i>	<i>M. javanica</i> , <i>M. incognita</i> , <i>M. arenaria</i> , <i>M. chitwoodi</i>	Me7, Mech1	Djian-Caporalino 2007
YW	<i>Capsicum annuum</i>	<i>M. arenaria</i>	Me5	Djian-Caporalino 2007



Günümüze kadar yapılan genetik haritalama çalışmaları sonucunda orijinalde PI322719 nolu *Capsicum annuum* tohum örneğinden türetilen PM687 nolu inbred (safdöl) hattın belirlenen *Me3* ve *Me4* genleri için bağlantılı olan moleküler işaretleyiciler belirlenmiştir (Djian-Caporalino ve ark. 2001). Ayrıca, bu iki genin biberin dokuzuncu kromozomu (P9) üzerinde lokalize olduğu ve birbirinden 10 cM uzakta olduğu gösterilmiştir (Djian-Caporalino ve ark. 2007). DH330 hattı ile yapılan genetik açılım analizlerinde PI201234 tohum örneğinden türetilmiş PM217 nolu inbred (safdöl) hatta taşınan *Me1* ve *M. chidwoodi* ye dayanıklılık sağlayan *Mech2* geninin bağlantılı olduğu ve birbirinden 0.13 cM mesafede yer aldığı gösterilmiştir (Berthou ve ark. 2003). İlaveten, *M. chitwoodi* (*Mech1*) ve *M. incognita* (*Me7*) ya dayanıklılık sağlayan iki lokus CM334 nolu genotipten türetilmiş PM702 nolu inbred (safdöl) hattın belirlenmiştir. Ancak, yapılan haritalama çalışmalarında bu altı geninde birbiriyle bağlantılı olduğu ve dokuzuncu kromozom üzerinde 28 cM lık bir bölgede grup halinde lokalize olduğu belirlenmiştir (Djian-Caporalino ve ark. 2007). Ayrıca, Carolina Wonder ve Charleston Belle çeşitlerinde yer alan *N* geni ile ilgili yapılan markör belirleme çalışmalarında ise bu genle bağlantılı olan bir AFLP (Thies 2004) ve bir SCAR markörü (Wang ve ark. 2009) geliştirilmiştir. Ancak, günümüze kadar yapılan çalışmalarda *N* geninin biber genomundaki pozisyonu ve moleküler ıslah çalışmalarında daha etkili, yakın, daha güvenilir ve pratik kullanılacak biber spesifik bir markör ortaya konulamamıştır. Dolayısıyla, önerilen bu projede öncelikle *N* geninin biber genomundaki yeri yüksek çözünürlükte belirlenmiştir. Bu işlem başarı ile yapıldıktan sonra *N* geni ile bağlantılı olan biber spesifik bir SSR ve SNPmarkörü geliştirilmiştir. Böylece, bu çalışmalarda elde edilen moleküler işaretleyiciler *N* geninin MAS uygulamaları ile öncelikle Yüksel Tohumculuk Firması biber çeşitlerine aktarılmasına başlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### 1. Nematod Testlemeleri

Biber hatlarının dayanıklılık testlemelerinde *Meloidogyne incognita* ırk 2 kullanılmıştır. Türkiye’de sebze ve meyve yetiştirilen tarım arazilerinde yapılan çalışmalarda *M. incognita* ve *M. javanica* örtü altı üretim yapılan bölgelerde en yaygın kök-ur nematodu türü olarak belirlenmiştir. Bu türler üzerinde yapılan ırk çalışmaları sonucunda *M. incognita*’nın ırk 2, *M. javanica*’nın ise ırk 1’inin daha yaygın ırklar oldukları tespit edilmiştir. *M. javanica* ırk 1 biber kültürlerinde gelişmemektedir. Dolayısıyla, biber tarımı için çok fazla ekonomik önemi yoktur. Özarslandan ve Elekçioğlu (2003) ülkemizde ticari olarak yetiştiriciliği yapılan

biber çeşitlerinde *M. javanica* ırk 1'in gelişmediğini göstermişlerdir. *M. incognita* ırklarından ise ülkemizde yalnızca ırk 2 yaygın olarak bulunduğu yapılan farklı çalışmalarda belirlenmiştir. Bu nedenle projede biber hatlarının testlenmesinde daha önce projelerde alt yapı çalışmaları tamamlanan *M. incognita* ırk 2 popülasyonları kullanılmıştır. TÜBİTAK-TOVAG 107O016 no'lu araştırma projesi kapsamında *Meloidogyne incognita* ırk 2'nin saf kültürleri oluşturulmuştur, morfolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak tür tanısı, North Carolina konukçu testi kullanılarak ise ırk tanısı yapılmıştır. Kök-ur nematodunun üretimi ve bitki testleme çalışmalarında %76 kum, %7 kil ve %17 mil karışımı toprak ve 250 ml plastik saksılar kullanılmıştır. Denemelerde kullanılacak toprak karışımı 121 °C sıcaklıkta 20 dakika otoklav yapılarak sterilize edilmiştir. Çalışma 25±1 °C sıcaklık ve % 65±5 nem içeren bitki yetiştirme kabinlerinde yürütülmüştür.

### **1.1. *Meloidogyne incognita* ırk 2'nin üretilmesi**

#### **1.1.1. Bitkilerin yetiştirilmesi**

Çalışmada Kök-ur nematodu üretimi son derece duyarlı reaksiyon gösteren Tueza domates çeşidinde yapılmıştır. Domates tohumları fide harcı bulunan viyollere ekilmiş ve fideler 2. gerçek yapraklı döneme geldiklerinde her bir saksıya 1 bitki olacak şekilde steril toprak doldurulmuş saksılara şaşırtılmıştır.

#### **1.1.2. Kök-Ur Nematodu İnokulasyonu ve Üretimi**

Tueza F1 domates fideleri 4. gerçek yapraklı döneme geldiğinde her bir bitkiye kök boğazı yakınında açılan deliklere (yaklaşık 2 cm derinliğinde) 1000 adet infektif *M. incognita* ırk 2 ikinci dönem larvası inokule edilmiştir. İnfekte edilen domates fideleri 8 hafta süreyle *M. incognita* ırk 2'nin üremesi için saksı içerisinde iklim kabinlerinde yetiştirilmiştir. Testleme çalışmalarında yeterli sayıda kök-ur nematodu popülasyonu elde etmek için üretimde yaklaşık 100 adet bitki kullanılmıştır. İnokulasyondan 8 hafta sonra bitkiler sökülerek urlu köklerde dışilerin oluşturduğu yumurta kümeleri binoküler mikroskop altında toplanmış ve geliştirilmiş Baermann-Huni yöntemi (Hooper 1986) ile yumurta kümelerinden infektif ikinci dönem larvalar elde edilmiştir. Elde edilen infektif larvalar testleme çalışmalarında kullanılmıştır. Bitkilere nematod inokulasyonu için ortalama 1000'er adet infektif larva ışık mikroskobu altında santrifüj tüplerine sayımları yapılarak inokulasyona hazır hale getirilmiştir.

### **1.2. Testleme Çalışmaları**

#### **1.2.1. Dayanıklı Gen Kaynaklarının *M. incognita* ırk 2 ile Testlenmesi**

Projede kök-ur nematodlarına dayanıklı biber genetik kaynakları kullanılmıştır. Denemede karşılaştırma yapmak için standart çeşit olarak California Wonder biber çeşidi duyarlı çeşit olarak kullanılmıştır. Çalışma 10 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Çalışmada kullanılacak olan bitkilerin tohumları viyollere ekilmiş ve gerçek yapraklar oluştuktan sonra içerisinde steril kumlu toprak bulunan 250 ml plastik saksılara şaşırtılmıştır. Fideler 2-4. gerçek yapraklı döneme geldiğinde kök boğazı etrafında açılan 2 cm derinliğindeki deliklere ikinci dönem larvalar inokule edilmiştir. Denemeler  $25\pm 1$  °C (gündüz) ve  $20\pm 1$  °C (gece) sıcaklık ve %  $65\pm 5$  nem içeren tam kontrollü iklim odası koşullarında 10 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. İnokulasyondan 8 hafta sonra deneme sonlandırılmış ve değerlendirmeler yapılmıştır.

### 1.2.2. F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> ve F<sub>3</sub> Bitkilerinin *M. incognita* ırk 2 ile Testlenmesi

Dayanıklı ve duyarlı bitkilerin melezlemesi sonucu elde edilen F<sub>1</sub> ve F<sub>2</sub> tohumları viyollere dikilmiş ve ilk gerçek yaprakları oluştuktan sonra steril kumlu toprak bulunan plastik saksılara alınmıştır. Bitkiler 2-4 gerçek yapraklı döneme geldiğinde kök boğazı etrafında açılan 2 cm derinliğindeki deliklere yaklaşık 1000 adet ikinci dönem larva inokule edilmiştir. Denemeler  $25\pm 1$  °C (gündüz) ve  $20\pm 1$  °C (gece) sıcaklık ve %  $65\pm 5$  nem içeren tam kontrollü iklim odası koşullarında yürütülmüştür. İnokulasyondan 8 hafta sonra bitkiler sökülerek deneme sonlandırılmış ve değerlendirmeler yapılmıştır.

### 1.3. Nematod Testlemesi Sonuçlarının Analiz Edilmesi

Nematod testleme çalışmaları inokulasyondan 8 hafta sonra sonlandırılmıştır. Bitkiler söküldükten sonra kökler yıkanmış ve köklerde urlanma oranları (GI): yüzde olarak köklerdeki urlanma oranı 0-10 urlanma oranı indeksi kullanılarak belirlenmiştir. Urlanma oranı %20'nin altında ise bitki dayanıklı olarak değerlendirilmiştir (Barker, 1985). Köklerde yumurta kümesi sayısı: Her bir kök sisteminde yumurta kümeleri sayılmış ve bulunan değer 20'den az ise bitki dayanıklı, 20'den çok ise duyarlı olarak değerlendirilmiştir (Hadisoeganda ve Sasser 1982).

## 2. Genetik Materyallerin Oluşturulması

Denemede kullanılacak genetik materyaller aşağıdaki Tablo 2 de özetlenmiştir.

Tablo 2. Çalışmada dayanıklı kaynak olarak kullanılan biber genotipleri

Tür	Genotip	Kaynak	Nematoda Tepkisi
<i>Capsicum annuum</i>	Carolina Wonder	USDA	Dayanıklı



	(CW)		
<i>Capsicum annuum</i>	Charleston Belle (CB)	USDA	Dayanıklı

Proje kapsamında nematoda dayanıklı bulunan kaynaklar (CW ve CB) Yüksel Tohumculuk Firması tarafından temin edilen duyarlı bir biber çeşiti (AZN-1) ile melezlenmiştir. Bu çalışmada Carolina Wonder ve Charleston Belle'den gelen *N* dayanıklılık geninin Yüksel Tohumculuk Firmasına ait AZN-1 biber çeşitine moleküler markörler kullanılarak aktarılması konu olarak seçilmiştir. Carolina Wonder ve Charleston Belle çeşitlerinin dayanıklı gen kaynağı olarak seçilmesinin diğer önemli bir nedeni ise bu genotiplerin Türkiye'de biberlere ekonomik düzeyde zarar yapan üç ana nematod türüne de dayanıklılık sağlamasıdır. Aynı zamanda, bu kaynaktan gelen dayanıklılık genleri 28 °C'nin üzerindeki yüksek sıcaklıklarda da etkisini göstermektedir. Dayanıklı genotiplerle (CW ve CB) firma çeşitleri arasında yapılan melezlemeler sonucunda elde edilen F1 melezleri (her bir kombinasyondan en az 10 adet melezleme yapılmıştır) nematod testlemelerine tabi tutulmuş ve dayanıklılığında emin olunan en az 10 adet F1 bitkisi kendilenecek F2 populasyonları ve uygun anaca (AZN-1) geriye mezlenerek en az 100 bitkiden oluşacak olan bir BC1F1 generasyonu geliştirilmiştir. En az 250 bitkiden oluşan bir F2 populasyonu gen haritalama ve markör belirleme çalışmalarında kullanılmıştır. Uygun büyüklüğe ulaşan (4 yapraklı dönem) bitkiler nematodla testlenmiş ve her bir bitkinin nematod inokülasyonuna olan tepkisi belirlenmiştir. Nematod testlemeleri sonucunda sadece dayanıklı bulunan F2 bitkileri nematod okumaları sonunda tekrar sera koşullarında toprağa aktarılmıştır. Bu bitkiler daha sonra kendilenecek F3 generasyonu oluşturulmuştur. Elde edilen bu F3 generasyonuna ait bitkiler (herbirinden en az 10-20 bitki örneği) tekrar nematod testlemelerine tabi tutulmuştur. Böylece, hem F2 generasyonundaki tepkimelerinin doğruluğu ortaya konmuş ve hemde *N* geni için geliştirilen markörlerin dayanıklılık geni ile açılım gösterip göstermediği belirlenmiştir.

### 3. Genetik Haritalama ve Moleküler İslah Çalışmaları

Moleküler markör belirleme ve haritalama çalışmaları için bir F2 populasyonu kullanılmıştır. Dayanıklı bulunan F2 populasyonuna ait bireylerin kendilenmesi ile geliştirilmiş olan F<sub>2:3</sub> populasyonunda markör doğrulama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Haritalama çalışmaları için öncelikle, nematod testlemeleri başlamadan önce her bir F2 bitkisinden DNA'lar çıkarılmıştır. Bitki DNA'larının izole edilmesi için Fulton ve ark. (1995) tarafından tanımlanan yöntem kullanılmıştır.





Nematod testlemelerinde 25°C'lik sıcaklık rejimi uygulanmıştır. Populasyonlar bu sıcaklıkta nematodla testlenmiş ve fenotipik olarak karakterize edilmiştir.

### 3.1. SSR ve COSII Markör Analizleri

Biber genomuna özel olarak geliştirilen SSR primerleri ile COSII Markörleri, öncelikle PCR ile çoğaltılmıştır. PCR karışımı içerisinde: 10µM'lık ileri ve geri primerlerden 0.75 µl, 1X PCR tampon çözeltisi, 0.50 µl dNTP karışımı (10mM), 0.5 U Taq DNA polimeraz enzimi ve yaklaşık 50 ng genomik kalıp DNA yer alacak şekilde kullanılmıştır. PCR amplifikasyon protokolü: 95 °C'de 4 dakika ön denatürasyon, ardından 35 döngü 94 °C/30 saniye denatürasyon, 50- 55°C/30 saniye tavlama (annealing), 72 °C/45 saniye uzama (extension) ve son aşama olarak 72 °C'de 10 dakika son uzama ve 4°C'de tutmayı içerecek şekilde standardize edilmiştir. Herbir PCR ürünü, Fragment Analyzer (Advanced Analytical) kapiler elektroforez sisteminde yüksek çözünürlükte görüntülenmiştir. SSR bantları arasındaki uzunluk farklarının en yüksek hassasiyette belirlenebilmesi için, örneklerin kapiler sistemde yürütülmesinde DNF900 Reagent Kit (Advanced Analytical), üreticinin talimatları doğrultusunda kullanılmıştır. SSR bantları, ProSize 2.0 (Advanced Analytical) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Uzunluk yönünden polimorfizm göstermeyen COSII markörleri restriksiyon enzimleri ile kesilerek polimorfizm aranmış ve polimorfik olan PCR bantları co-dominant olarak skorlanmıştır.

### 3.2. SRAP Markör Analizleri

SRAP markör sistemi, bitki genlerinin açık okuma bölgelerini (ORF) hedefleyen primerlerin kombinasyonlar halinde kullanılması ile, farklı bitki türlerinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ürünü üretebilen, dominant, tekrar edilebilirliği yüksek bir markör sistemidir. Bu yöntem gere: 20 µL PCR karışımı içerisinde 2 µl 10X PCR tampon çözeltisi, 20-50 ng DNA, 2 µl Mg<sup>2+</sup>, 0.7 µl dNTP, 2µl ileri (forward) primer, 2 µl geri (reverse) primer ve 0.3 µl Taq DNA polimeraz enzimi yer alacak şekilde gerçekleştirilmiştir. PCR amplifikasyonu öncelikle 94°C'de 5 dakikalık bir ön denatürasyon işlemi yapılmıştır. Bu işlemden sonra 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 35°C'de 1 dakika annealing ve 72°C'de 1 dakika uzama işlemleri 5 döngü halinde uygulanmıştır. Daha sonra, annealing sıcaklığı 55°C'ye yükseltilerek, işlem bu şekilde 35 döngü daha yapılmıştır. En sonunda 72°C'de 10 dakika süreyle son bir uzama gerçekleştirilerek PCR işlemi tamamlanmıştır. Agorose jel elektroforezinde PCR ürünleri yürütülmüş ve polimorfik bantlar var/yok şeklinde skorlanmıştır.

### 3.3. SNP Markörü Analizleri

Güney Kore'nin Seoul Üniversitesi'nden Doil Choi ve arkadaşları, 2013 yılında biber genomunu dizileme analizlerini tamamlamışlardır. Proje kapsamında biyoinformatik araçlar kullanılarak N genine ait genom bölgesinin dizileri incelenmiştir ve bu bölgeye ait diziler üzerinden primerler dizayn edilmiştir. Daha sonra bu primerler ile haritalama populasyonunun ebeveplerinde SNP markörü belirlemek için dizileme analizleri gerçekleştirilmiştir. Belirlenmiş olan aday SNP markörleri CAPS yöntemi kullanılarak genotiplenmiştir.

### 3.4. SNP genotipleme için CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) analiz yönteminin geliştirilmesi

Dizileme analizi ile belirlenen SNP konumlarının haritalama populasyonunda genotiplenmesinde, SNP alleleine bağlı restriksiyon profili farklarının gözlemlenmesine dayalı CAPS yöntemi kullanılmıştır. SNP'lere özel CAPS yöntemi geliştirilmek üzere öncelikle her bir SNP'i içeren DNA dizisi, NEBcutter V2.0 yazılımı kullanılarak incelenmiştir. Dizi içerisinde SNP konumuna denk düşen restriksiyon enzimi tanıma bölgesi bulunuyor ise, SNP alleleine bağlı olarak enzimin motifi tanıma özelliğinin değişip değişmediği analiz edilmiştir. Bu işlem geliştirilen her bir aday SNP markörü için gerçekleştirilmiş olup, restriksiyon enzimi motifini değiştiren SNP'ler, CAPS analiz yöntemi ile genotiplenmek üzere seçilmiştir. SNP'ler, CAPS yöntemi ile öncelikle haritalama populasyonunun ebeveynlerinde genotiplenerek gösterdikleri polimorfizm doğrulanmıştır, ardından haritalama analizleri için gerekli olan verileri elde etmek üzere CAPS analizleri popülasyona uygulanmıştır.

#### 3.4.1. CAPS analiz yöntemi

SNP'leri barındıran DNA bölgeleri öncelikle PCR ile çoğaltılmıştır. PCR amplifikasyonu için 1x AmplitaqGold® PCR Tamponu, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200µM her bir dNTP (Promega), 300 nM her bir primer, 1 ünite AmplitaqGold® polimeraz enzimi (Applied Biosystems Foster City CA), 4.0µL (100 ng) DNA ve nükleaz içermeyen H<sub>2</sub>O içeren bir protokol hazırlanmış olup. Toplam reaksiyon hacimleri 100µL'dir. PCR ürünleri belirtilen program ile çoğaltılmıştır; başlangıç DNA denatürasyonu için 95°C'de 10 dakika; 35 döngü 95°C'de 30 saniye (denatürasyon), 55-60°C'de 30 saniye tavlama (annealing), 72°C'de 30 saniye uzama (extension) ve 1 döngü 72°C'de 10 dakika son uzama ve 4°C'de tutma. PCR ürünleri, DNA Clean and Concentrator (Zymo) kit kullanılarak saflaştırılmıştır, ardından NEBcutter V2.0 yazılımı kullanılarak tespit edilmiş olan restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu enzim için uygun sıcaklıkta

gerçekleştirilmiştir. Restriksiyon karışımları, 20µl saflaştırılmış PCR ürünü, 10U restriksiyon enzimi (NEB), 1X restriksiyon tampon içerecek ve reaksiyon hacmi sterilize distile su ile 25µl'ye tamamlanacak şekilde standardize edilmiştir. Reaksiyon inkübasyon sıcaklığı ve süresi, her bir enzim için üreticinin protokolü doğrultusunda uygulanmıştır. Restriksiyon ürünleri, Fragment Analyzer (Advanced Analytical) kapiler elektroforez sisteminde görüntülenmiş olup, örneklerin cihazda yürütülmesinde, DNF900 Reagent Kit (Advanced Analytical) kullanılmıştır. SNP alleleline dayalı restriksiyon profil farkları, ProSize (Advanced Analytical) yazılımı ile görüntülenip, co-dominant şekilde skorlanmıştır.

### 3.5. Data Analizleri

Haritalama populasyonun ebeveynleri arasında polimorfik bulunan SSR, SRAP, COSII ve SNP markörleri, populasyondaki açılımları temel alınarak genotiplerin özgün bir lokus için her bir SNP ve mikrosatellite değerleri: var (present) için 1, yok (absent) için 0 ve heterozigot bireyler içinde 0,5 gibi değerlerle skorlanmıştır, dominant markörler için ise var/yok (1/0) skorlaması gerçekleştirilmiştir. Veriler bağlantı haritalamasında kullanılmak üzere JoinMap yazılımı Kosambi haritalama fonksiyonu kullanılarak ele alınmış ve bağlantı haritası oluşturulmuştur.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### 1. Nematod Testlemesi

#### 1.1. Nematod İnokulum Kaynaklarının Üretilmesi

Proje kapsamında dayanıklılık kaynağı olarak kullanılacak biber genotiplerinin nematod ile testlenmesinde, Türkiye'de sebze ve meyve yetiştirilen alanlarda en yaygın kök-uru nematod türü olarak saptanan *Meloidogyne incognita* ırk 2 (KA1 ve G3 izolatları) kullanılmıştır (Özarslan ve Elekçioğlu 2003). Kök-ur nematodunun üretimi ve bitki testleme çalışmalarında %76 kum, %7 kil ve %17 mil karışımı toprak ve 250 ml plastik saksılar kullanılmıştır. Denemelerde kullanılacak toprak karışımı 121 °C sıcaklıkta 20 dakika süreyle otoklav yapılarak sterilize edilmiştir. Çalışma 25±1 °C sıcaklık ve % 65±5 nem içeren bitki yetiştirme kabinlerinde yürütülmüştür. Çalışmada, öncelikle, testlemelerde kullanılacak inokulum kaynakları oluşturulmuştur. Bu amaç için, proje başlatılmadan iki ay önce, kök-uru nematoduna yüksek düzeyde duyarlılık gösteren bir domates çeşiti (Tueza F1) kök-uru nematodu üretimi için kullanılmıştır. Bu işlem için yaklaşık 50 civarında Tueza F1 çeşitine ait tohumlar ekilmiş ve elde edilen fideler 4 gerçek yapraklı döneme geldiklerinde her bir bitkiye kök boğazı yakınında açılan deliklere (yaklaşık 2 cm derinliğinde) 1000'er

adet infektif *M. incognita* ırk 2 KA1 ve G3 izolatlarına ait ikinci dönem larvaları inokule edilmiştir. İnfekte edilen domates fideleri 8 hafta süreyle *M. incognita* ırk 2'nin üremesi için saksı içerisinde iklim kabinlerinde yetiştirilmiştir. İnokulasyondan 8 hafta sonra bitkiler sökülerek urlu köklerde dişilerin oluşturduğu yumurta kümeleri binoküler mikroskop altında toplanmış ve Baermann-Huni yöntemi (Hooper 1986) ile yumurta kümelerinden infektif ikinci dönem larvaları elde edilmiştir. Elde edilen bu infektif larvalar nematod testleme çalışmalarında kullanılmak üzere +4 °C'ye kaldırılmıştır.

### 1.2. Dayanıklılık Genetik Kaynakların *M. incognita* ırk 2 KA1 ve G3 izolatları ile Testlenmesi

Projede kök-ur nematodlarına dayanıklılık sağlayan *N* genini taşıdığı daha önceki çalışmalarda (Thies ve ark. 2000) rapor edilen ve USDA'den temin edilen iki adet biber genotipi (Carolina Wonder ve Charleston Belle) genetik kaynak olarak kullanılmıştır (Şekil 1).



*Capsicum annuum* cv. Charleston Belle    *Capsicum annuum* cv. Carolina Wonder

Şekil 1. Çalışmada dayanıklılık genetik kaynak olarak kullanılan biber genotiplerinin resimleri görülmektedir.

Denemeye karşılaştırma yapmak için standart çeşit olarak Kaliforniya Wonder biber çeşidi duyarlı çeşit olarak eklenmiştir. Çalışmada her genotip 6-10 bitki ile temsil edilmiştir. Çalışmada kullanılan bitkilerin tohumları viyollere ekilmiş ve gerçek yapraklar oluştuğundan sonra içerisinde steril kumlu toprak bulunan 250 ml plastik saksılara şaşırtılmıştır. Fideler 4. gerçek yapraklı döneme geldiğinde kök boğazı etrafında açılan 2 cm derinliğindeki deliklere ikinci dönem larvalar inokule edilmiştir. Denemeler 25±1 °C (gündüz) ve 20±1 °C (gece) sıcaklık ve % 65±5 nem içeren tam kontrollü iklim odası koşullarında 6-10 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. İnokulasyondan 8 hafta sonra denemeler sonlandırılmıştır ve

değerlendirmeler yapılmıştır. Bitkiler plastik saksılardan söküldükten sonra bitkilerin kökleri yıkanmış ve köklerinde urlanma oranları (GI = Gallig Index) 1-5 urlanma oranı indeksi kullanılarak belirlenmiştir (Barker 1985). Urlanma oranı %20'nin altında ise bitki dayanıklı olarak değerlendirilmiştir (Barker 1985). Ayrıca her bir bitki kökündeki yumurta kümesi sayısı sayılmıştır. Bulunan değer 20'den az ise bitki dayanıklı, 20'den çok ise duyarlı olarak değerlendirilmiştir (Hadisoeganda ve Sasser 1982).

#### 1-5 Skalası:

- 1: Kök sisteminin % 0-3 urlu veya yumurta kümeleri ile kaplı
- 2: Kök sisteminin % 4-25'i urlu veya yumurta kümeleri ile kaplı
- 3: Kök sisteminin % 26-50'si urlu veya yumurta kümeleri ile kaplı
- 4: Kök sisteminin % 51-80'i urlu veya yumurta kümeleri ile kaplı
- 5: Kök sisteminin % 81-100'u urlu veya yumurta kümeleri ile kaplı

Nematod testlemeleri sonucunda, çalışmada dayanıklı genetik kaynak olarak kullanılan biber genotipleri (Charleston Belle ve Carolina Wonder) ülkemizde biber yetiştirilen alanlarda problem olan *M. incognita* ırk 2'ye karşı dayanıklı bulunmuşlardır, Yüksel Tohumculuğa ait safhat (AZN-1) (Şekil 2) ve duyarlı kontrol olarak kullanılan California Wonder ise duyarlı bulunmuştur. Tablo 1 bütün bitkilerden elde edilen sonuçları ve Tablo 2 ise genel değerlendirmeleri göstermektedir.

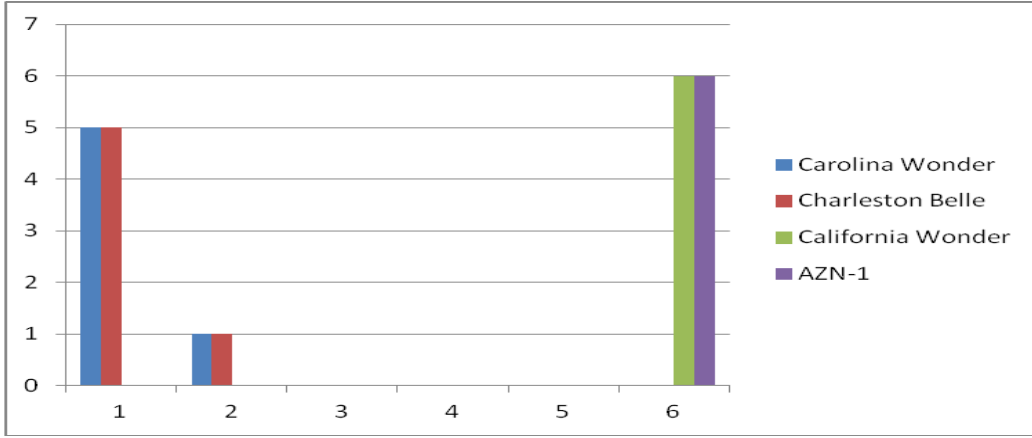


Şekil 2. Melezleme çalışmalarında anaç olarak kullanılacak Yüksek Tohumculuk Firmasına ait biber çeşiti AZN-1 ait resim

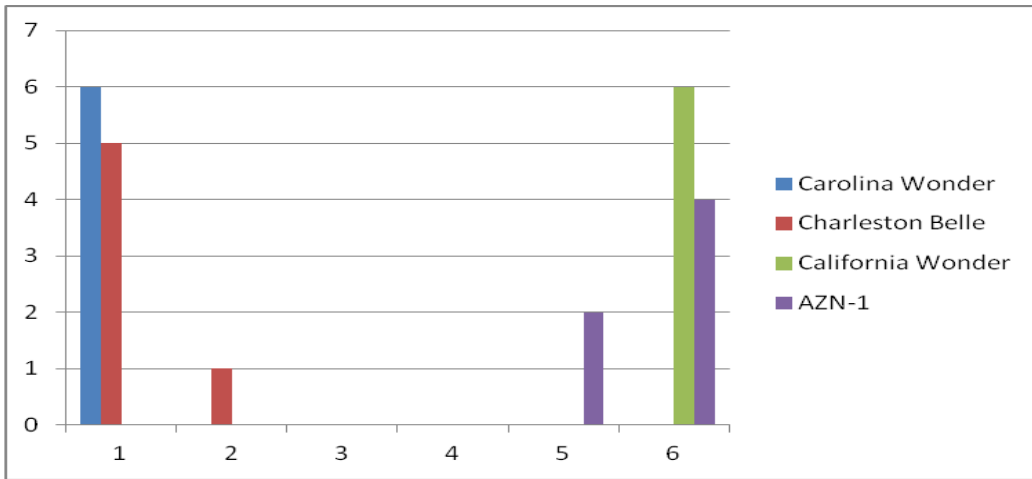
Tablo 3. Çalışmada kullanılan iki izolat ile yapılan nematod testleme sonuçları

<i>M. incognita</i> izolat	Genetik Kaynak	Fenotipik Değerlendirme		
	Carolina Wonder	Yumurta Paketi	Skala	Sonuç
KA1		0	0	R
		0	0	R
		1	1	R
		0	0	R
		0	0	R
		0	0	R
	Charleston Belle			
		0	0	R
		0	0	R
		1	1	R
		0	0	R
		0	0	R
		0	0	R
		>100	5	S
		>100	5	S
		>100	5	S
		>100	5	S
		>100	5	S
		5		
<i>M. incognita</i> izolat	Genetik Kaynak	Fenotipik Değerlendirme		
	Carolina Wonder	Yumurta Paketi	Skala	Sonuç
G3		0	0	R
		0	0	R
		0	0	R
		0	0	R
		0	0	R
		0	0	R
	Charleston Belle			
		0	0	R
		1	1	R
		0	0	R
		0	0	R
		0	0	R
		0	0	R
		75	4	S
		72	4	S
		150	5	S
		120	5	S
		150	5	S
	100	5	S	

Bu sonuçlara göre denemede kullanılan dayanıklı biber genotipleri Türkiye’de problem olan *M. incognita* ırk 2’nin iki farklı izolatınada (KA-1 ve G3) dayanıklılık göstermiştir. Şekil 3A ve 3B genotipler arasında yapılan istatistik analizleri ile elde edilen sonuçları göstermektedir.



Şekil 3A. KA1 izolatu ile yapılan testleme sonuçları histogramı



Şekil 3B. G3 izolatu ile yapılan testleme sonuçları histogramı

Bu sonuçlara göre, yapılan t-testi ile dayanıklı kaynaklar (Carolina Wonder ve Charleston Belle) iki duyarlı genotiple (Carolina Wonder ve AZN-1) kök-uru nematoduna tepki bakımından istatistiki olarak önemli derecede ( $P > 0.001$ ) farklılık göstermiştir. Buna karşın, dayanıklı kaynaklar arasında kök-uru nematoduna tepki bakımından önemli derecede bir farklılık gözlenmemiştir. Projede kullanılan biber genotiplerinin nematoda tepkimeleri Tablo 4'de verilmiştir. Ayrıca, çalışmada kullanılan dört genotipin nematod testlemesi sonucu elde edilen kök resimleri Şekil 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4. Testleme çalışmasında kullanılan genetik materyaller ve nematoda gösterdikleri tepkiler

	Genotip	Ur Skalası (1-5)	Yumurta Kümesi Sayısı	Nematoda Tepkisi
1	AZN-1 (Yüksel Tohumculuk)	4	> 97	Duyarlı
2	Charleston Belle	1	3	Dayanıklı
3	California Wonder (USDA)	4	> 83	Duyarlı
4	Carolina Wonder	1	4	Dayanıklı



Şekil 4. Nematod testlemesi sonucu elde edilen kök resimleri

### 1.3. Dayanıklı Bulunan Hatların Yüksel Tohumculuk Firması Çeşitleri Melezlenmesi

Kök-uru testlemeleri sonucunda Türkiyede problem olan *M. incognita* ırk 2 izolatlarına karşı dayanıklı oldukları gösterilen biber genotipleri ile Yüksel Tohumculuk Firmasına ait kök-uru nematoduna duyarlı bir biber çeşiti (*Capsicum annuum* cv. AZN-1) arasında en az 10 kombinasyon halinde melezlemeler yapılmıştır ve F1 generasyonları oluşturulmuştur. Aşağıdaki resimlerde AZN-1 çeşiti üzerine yapılmış melezler görülmektedir (Şekil 5). Daha sonra, dayanıklı oldukları nematod testlemeleri ile doğrulanan F2 bitkileri kendilenerak F2 ve AZN-1 çeşitine geriye melezlenerek BC1F1 generasyonu oluşturulmuştur.





Şekil 5. Capsicum annuum cv. AZN-1 ile yapılan melezler

Ayrıca, projede öngörülen B planı gereği N genini taşıyan diğer biber genotipleri ve dayanıklı kaynaklarla yapılan melezlemeler sonucu elde edilen F1'ler nematod testlemesine tabi tutulmuştur. Bu çalışmada kullanılan biber genotipleri ve nematod testlemesine alınan bitki sayıları aşağıdaki Tablo 4A 'da verilmiştir.

Tablo 4A. İkinci rapor döneminde nematod testlemesine alınan biber genotipleri

Materyal	Bitki Sayısı	AÇIKLAMA
AZN-1	32	Hassas Kültür Formu Biber
Caroline Wonder	32	N Dayanıklı
Charleston Belle	32	N Dayanıklı
07T197, Capsicum frutescens	32	N Dayanıklı
Charleston Belle X 07T197	32	F1
Caroline Wonder X 07T197	32	F1
Caroline Wonder X AZN-1	32	F1
Charleston Belle X AZN-1	32	F1
PA353	32	Red Habanero, Capsicum chinense, M. incognita race 3
PA398	32	Jamaica Scotch Bonnet, Capsicum chinense, M. incognita race 3
PA426	24	Yellow Scotch Bonnet, Capsicum chinense, M. incognita race 3
Numex Nematodor - 1	24	N Dayanıklı İki farklı tip vardı, tip 1

Numex Nematodor - 2	15	N Dayanıklı, iki farklı tip vardı, tip 2
---------------------	----	--

Biber genotipleri ile kurulan denemeler 2 farklı inokulum yoğunluğunda iklim odası koşullarında  $24\pm 2$  C sıcaklık ve %  $60\pm 10$  nem koşullarında yapılmıştır. Denemelerde testleme çalışmaları *M. incognita* ırk 2 Antalya populasyonu ile yapılmıştır. Birinci deneme 5 tekerrürlü olarak kurulmuştur ve kök-uru nematodunun 10-12 yumurta paketi, yaklaşık 5000 yumurta inokulasyonu yapılmıştır. İkinci deneme 7 tekerrürlü olarak kurulmuştur ve yaklaşık 2000 infektif ikinci dönem larva inokule edilmiştir. Çalışma sonucunda dayanıklı bitki materyallerinden Numex 1 ve Numex 2 çeşitleri *M. incognita* ırk 2'ye karşı yüksek kök-uru nematodu inokulasyonunda duyarlı reaksiyon göstermiştir. Düşük yoğunlukta bu çeşitlerde gal indeksi 3'ün altında (0-10 Zeck Skalasına göre) bulunmuştur. Her iki Numex çeşidinde de birbirine yakın sonuçlar alınmıştır. Denemeye alınan diğer çeşitlerde yüksek derecede dayanıklılık tespit edilmiştir. En duyarlı çeşit AZN-1 olarak tespit edilmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. Nematod testleme sonuçları

Biber CV	5000 Yumurta inokulasyonu		2000 Larva inokulasyonu	
	Gal indeksi	YP+Gal sayısı	Gal indeksi	YP+Gal sayısı
Charleston Belle X 07T197	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a
Caroline Wonder	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a
Caroline Wonder X AZN-1	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a
Charleston Belle	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a
Caroline Wonder	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a	0,0±0,0a
AZN-1 X Charleston Belle	0,4±0,3a	0,8±0,6a	0,14±0,2a	0,3±0,3a
07T197	1,0±0,8a	15,2±12,7a	0,5±0,3a	2,5±1,2a
PA 353	0,2±0,2a	1,2±1,2a	0,3±0,2a	1,5±1,1a
PA 398	0,8±0,4a	6,4±3,5a	0,3±0,2a	1,5±1,0a
PA 426	0,6±0,3a	2,2±1,2a	0,3±0,2a	1,0±0,8a
Numex Nematodor - 1	4,6±0,4b	78,0±8,7b	2,8±0,7b	37,8±14,9b
Numex Nematodor - 2	3,6±0,6c	54,6±12,1b	2,8±0,8b	32,6±14,8b
AZN-1	7,8±0,4d	258±25,6c	5,0±0,4c	78,6±5,4c

Bu testlemeler sonucunda dayanıklı bulunan bitkiler Yüksel Tohumculuk Firmasına gönderilmiştir. Dayanıklı bitkiler Firmada büyütülmüş ve kendilenmiştir.



Böylece, tohumluk sayıları artırılmıştır. Ayrıca, bu hatlar AZN-1 çeşiti ile de melezlenmiştir.

#### **1.4. N geni için Yüksel Tohumculuk Firmasında Yürütülen İslah Çalışmaları**

1. Proje kapsamında N nematod dayanıklılık geni taşıyan ve testleme ile dayanıklılığı belirlenen Carolina Wonder (CW) materyali firma bünyesinde farklı tiplerden (Sivri, Çarli, Dolma, California Wonder tipi, Macar Tipi, Kapy vb.) yaklaşık 30 hatla melezlenmiştir. Melezlemelerden sonra elde edilen F1'ler kendilenerak F2 ve sonrasında ise F3 generasyonu aşamasına gelmiştir. Farklı tiplerde N geni taşıyan nematod dayanıklı hatlar geliştirme ve hatları saflaştırma çalışmaları sonuçlandırılmış.

2. Proje kapsamında N geni taşıyan Carolina Wonder (CW) materyali ile AZN-1 materyali melezlenerek F1 ve F2 aşaması tamamlanmıştır ve haritalamada kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca, elde edilen F1 bitkileri hassas materyal (AZN-1) ile geri melezlenerek BC1F1 bitki popülasyonu oluşturulmuştur. Oluşturulan BC1F1 popülasyonu N geni tanımlamasında kullanılacak markörlerle taranacaktır ve dayanıklı bulunan bitkiler tekrar AZN-1 çeşiti ile geriye melezlenmek suretiyle BC2F1 generasyonu oluşturulacaktır. Paralel bir çalışma olarak dayanıklı bulunan BC1F1 bitkileri kendilenerak BC1F2 açılım popülasyonu oluşturulmuştur.

3. 256 adet F2 bitkisi nematodla testlenerek nematod dayanıklı ve hassas olanlar belirlenmiştir. Nematod dayanıklı F2 bitkileri seraya aktarılmıştır ve serada F3 tohumları elde edilmiştir. Elde edilen F3 hatları içinden bitki gelişimi (dik-yarı dik-yatık tip), yaprak, çiçeklenme, erkencilik ve meyve özellikleri yönünden istenilen tipe uygun en iyi 15 adet F3 hattı seçilmiştir.

4. Seçilen 15 F3 hattına ait elde edilen tohum miktarına bağlı olarak (15-40 adet arasında değişiyor) ekim yapılmıştır. Ayrıca nematod testlemesi için hassas California wonder, hassas AZN-1, dayanıklı Caroline wonder hatlarının her birinden 24'er bitki gelişecek şekilde ekim yapılmıştır. F3 bitkileri nematodla testlenmiştir. Testlenen bitkilerde dayanım durumları 2014 ilkbahar döneminde belirlenmiştir.

5. F2 aşamasındaki dayanıklılığın ıslah ve marker analizleri açısından F3 aşamasında da teyit edilmesi gerekmektedir. F2'de dayanıklı bulunup F3 aşamasından testlenen hatlarda dayanıklılığın seviyesi ve homozigot, heterozigot olma durumları belirlenecektir. Dolayısıyla F3'de nematod yönünden testlenen bir hatta ait 24 bitkinin hepsi patolojik teste dayanıklı çıkarsa bu hat için homozigot dayanıklı olacak 24 bitkiden bir kısmı dayanıklı bir kısmı hassas çıkarsa bu hat heterozigot dayanıklı olarak belirlenecektir. Bu aşamadan sonra moleküler

işaretleyici analizleri yapılacak ve analizler tamamlanmıştır. Moleküler analizlerin tamamlanması F3 bitkilerinin test sonucunu ile birlikte sağlanmıştır.

### 1.5. F2 populasyonlarının Nematod ile testlenmesi

Daha önceki rapor döneminde oluşturulan 2 adet F2 populasyonu (AZN x Carolina Wonder ve AZN x Charleston Belle)'ndan sadece bir tanesi bu rapor döneminde nematod ile testlemeye alınmıştır. Testlemeye sadece bir populasyonun alınmasının sebebi hem Carolina Wonder ve hemde Charleston Belle aynı gene (N genine) sahip olmalarıdır. Testlemeye 6 adet dayanıklı (Carolina Wonder), 6 adet duyarlı (AZN), 6 adet F1 (AZN x Carolina Wonder) ve 256 adet F2 bitkisi alınmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 6'de verilmiştir.

Tablo 6. F2 popülasyonu Nematod testleme sonuçları

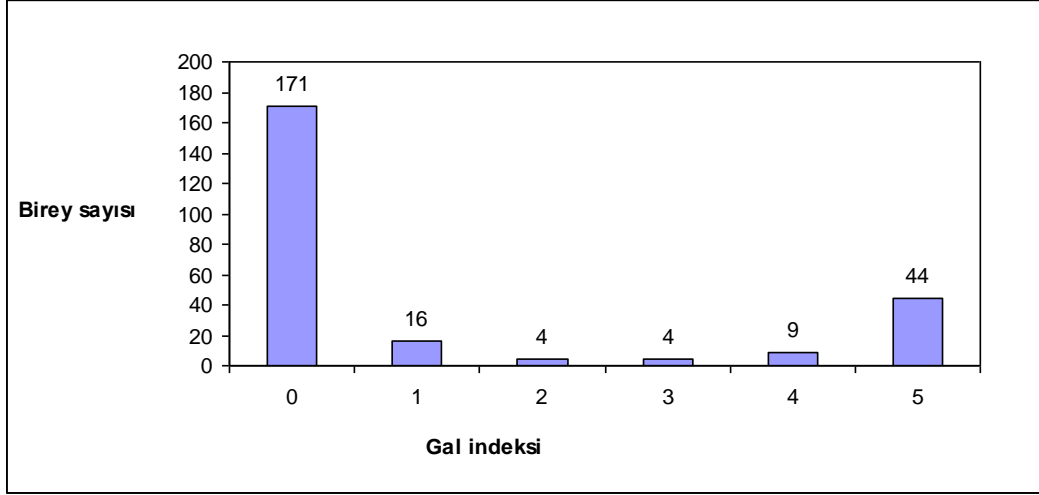
AZN-1 F2	Gal Sayısı	Gal indeksi
1	160	5
2	15	2
3	3	1
4	3	1
5	YOK	YOK
6	12	1
7	YOK	YOK
8	0	0
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0
13	0	0
14	15	2
43	10	1
44	270	5
45	0	0
46	0	0
47	0	0
48	0	0
49	0	0
50	0	0
51	0	0
52	12	1
53	346	5
54	200	5
55	15	2
56	0	0
57	4	1
58	0	0

59	0	0
60	0	0
61	0	0
62	0	0
63	228	5
64	0	0
65	0	0
66	0	0
67	0	0
68	72	4
69	0	0
70	0	0
71	0	0
72	0	0
73	0	0
74	0	0
75	0	0
76	62	4
77	70	4
78	125	5
79	0	0
80	114	5
81	0	0
82	351	5
83	0	0
84	0	0
85	95	5
86	252	5
87	0	0
88	0	0
89	0	0
90	0	0
91	0	0
190	0	0
191	0	0
192	0	0
193	0	0
194	0	0
195	0	0
196	0	0
197	0	0
198	0	0
199	0	0
200	0	0
201	0	0

202	0	0
203	0	0
204	0	0
205	62	4
206	225	5
207	640	5
208	0	0
209	0	0
210	0	0
211	0	0
212	0	0
213	0	0
214	0	0
215	75	4
216	0	0
217	0	0
218	0	0
219	0	0
220	780	5
221	0	0
222	650	5
223	450	5
224	550	5
225	0	0
226	133	5
227	0	0
228	0	0
229	0	0
230	0	0
231	0	0
232	0	0
233	80	5
234	0	0
235	0	0
236	265	5
237	0	0
238	0	0

Testleme sonucunda F2 jenerasyonunu oluşturan bitkilerden 191 adeti (%77'ü) dayanıklı (kök-uru oluşturma endeks miktarlarına göre 0 ile 2 gallenme arasında) ve 57 adeti (%23'ü) duyarlı (kök-uru oluşturma endeksi 2 den fazla) olarak değerlendirilmiştir (Şekil 6). Şekil 6'da F2 dağılımı grafik olarak verilmiştir.

Şekil 6. *M. incognita* race 2 ırkı ile testlenen F2 bireylerinde Gal indeksi dağılımı



Şekil 6. Gal indeksinin birey sayısına dağılımını gösteren grafik

Elde edilen bu sonuçlardan 191:57 (3:1) açılım oranı N geni tarafından sağlanan dayanıklılığın tek bir dominant gen olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuç Chi-square testi ile doğrulanmıştır (p değeri: 0.88). Testlemeler sonucunda dayanıklı bulunan bütün F2 bireyleri nematod analizlerini müteakiben plastik saksılara alınmış ve hemen proje ortağı Yüksel Tohumculuk firmasına gönderilmiştir. Şu ana kadar sağlıklı durabilen 30 civarında F2 bitkisi kendilenerak F3 generasyonu oluşturulmuştur. Ayrıca, Daha önceki rapor döneminde yapılan çalışmalarda, üretilen dayanıklı F1'ler (AZN x Carolina Wonder ve AZN x Charleston Belle) AZN çeşitine geriye melezlenerek BC1F1 generasyonu oluşturulmuştur. Bu generasyona ait bitkiler hasat edilerek BC1F1 tohumları elde edilmiştir. Bu populasyonlar N geninin MAS (maköre dayalı seleksiyon) ile ıslah çalışmalarında kullanılacaktır. Ayrıca proje kapsamında yetiştirilen F2 popülasyonundan F3 popülasyonu türetilmiş ve nematod testlemesi yapılmış sonuçlar Tablo 7'de gösterilmiştir. Bu çalışmalara ilaveten, nematod testlemeleri sırasında, her bir F2 bitkisinden DNA izolasyonu için yaprak örnekleri alınmış ve DNA'lar Promega kiti kullanılarak izole edilmiştir. İzole edilen DNA'ların kalite ve kantitesi Nanodrop ile belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 8'te verilmiştir.

### 1.6. F3 populasyonlarının Nematod ile testlenmesi

Tablo 7'de F3 populasyonlarında yapılan nematod testlemeleri sonucu elde edilen veriler özetlenmiştir.

Tablo 7. F3 popülasyonu nematod testleme sonuçları

		Plant height	Root length	Galling number	Galling Index	F3 Fenotip
<b>1 Carolina Wonder (Dayanıklılı)</b>	1	23.2	16.0	0.0	0.0	R

	2	21.5	15.6	0.0	0.0	R
	3	20.2	20.5	0.0	0.0	R
	4	24.6	20.9	0.0	0.0	R
	5	17.1	8.7	0.0	0.0	R
	6	23.2	14.5	0.0	0.0	R
	7	21.0	14.1	0.0	0.0	R
	8	15.5	12.5	0.0	0.0	R
	9	17.0	15.5	0.0	0.0	R
	10	22.2	16.0	0.0	0.0	R
	11	20.5	15.4	0.0	0.0	R
	12	23.1	16.7	0.0	0.0	R
	13	19.6	17.1	0.0	0.0	R
	14	23.2	16.3	0.0	0.0	R
	15	20.6	14.8	0.0	0.0	R
<b>2 California Wonder (Duyarlı)</b>	1					
		23.2	11.5	852.0	5.0	S
	2	21.1	16.5	932.0	5.0	S
	3	23.5	12.5	745.0	5.0	S
	4	12.0	10.1	359.0	5.0	S
	5	23.5	13.6	655.0	5.0	S
	6	28.2	15.2	872.0	5.0	S
	7	23.7	6.5	358.0	5.0	S
	8	16.5	13.5	276.0	5.0	S
	9	18.1	15.7	728.0	5.0	S
	10	21.2	17.5	41.0	4.0	S
	11	24.8	12.5	688.0	5.0	S
	12	17.0	13.5	336.0	5.0	S
			1402.0			
	13	19.6		445.0	5.0	S
	14	21.6	14.4	541.0	5.0	S
	15	18.5	15.0	651.0	5.0	S
<b>3 AZN N (Duyarlı)</b>	1	31.5	15.2	455.0	5.0	S
	2	36.5	23.1	552.0	5.0	S
	3	36.2	15.6	825.0	5.0	S
	4	30.6	16.3	658.0	5.0	S
	5	33.1	20.5	553.0	5.0	S
	6	30.0	13.7	412.0	5.0	S
	7	36.8	19.5	653.0	5.0	S
	8	31.8	16.5	354.0	5.0	S
	9	26.3	11.5	535.0	5.0	S
	10	29.5	12.5	672.0	5.0	S
	11	35.1	14.6	832.0	5.0	S
	12	26.5	13.2	938.0	5.0	S
	13	31.5	14.1	720.0	5.0	S



	14	29.3	12.8	635.0	5.0	S
	15	30.3	13.4	711.0	5.0	S
<b>4 No'lu F3</b>	1	37.0	27.6	0.0	0.0	R
	2	29.5	19.5	0.0	0.0	R
	3	27.5	15.2	0.0	0.0	R
	4	32.5	16.5	475.0	5.0	S
	5	19.2	8.5	35.0	4.0	S
	6	39.4	17.5	3.0	2.0	R
	7	41.5	17.5	0.0	0.0	R
	8	39.5	16.6	0.0	0.0	R
	9	34.5	16.6	0.0	0.0	R
	10	23.5	23.3	0.0	0.0	R
	11	34.8	19.5	655.0	5.0	S
	12	28.5	21.0	0.0	0.0	R
	13	32.5	31.2	0.0	0.0	R
	14	43.5	22.0	0.0	0.0	R
	15	30.0	19.0	0.0	0.0	R
<b>5 No'lu F3</b>	1	26.1	18.2	0.0	0.0	R
	2	27.2	12.7	0.0	0.0	R
	3	26.2	12.6	0.0	0.0	R
	4	25.3	14.4	0.0	0.0	R
	5	30.5	19.5	360.0	5.0	S
	6	29.1	14.5	87.0	4.0	S
	7	28.5	17.1	0.0	0.0	R
	8	26.0	17.0	0.0	0.0	R
	9	27.2	20.7	0.0	0.0	R
	10	26.5	27.7	650.0	5.0	S
	11	25.6	13.2	0.0	0.0	R
	12	33.2	13.7	0.0	0.0	R
	13	28.6	11.5	0.0	0.0	R
	14	37.5	13.6	0.0	0.0	R
	15	24.4	18.5	0.0	0.0	R
<b>6 No'lu F3</b>	1	26.1	13.8	0.0	0.0	R
	2	26.0	14.5	0.0	0.0	R
	3	25.4	13.4	0.0	0.0	R
	4	24.6	15.5	0.0	0.0	R
	5	24.1	16.7	0.0	0.0	R
	6	31.0	12.5	0.0	0.0	R
	7	27.5	13.1	0.0	0.0	R
	8	29.5	15.5	0.0	0.0	R
	9	26.0	15.0	0.0	0.0	R
	10	24.5	17.2	0.0	0.0	R
	11	29.3	18.5	0.0	0.0	R

	12	29.0	15.2	0.0	0.0	R
	13	29.6	15.3	0.0	0.0	R
	14	31.5	17.6	0.0	0.0	R
	15	29.3	11.6	0.0	0.0	R
<b>7 No'lu F3</b>	1	32.6	13.5	0.0	0.0	R
	2	30.1	13.7	85.0	4.0	S
	3	30.0	14.5	3.0	2.0	R
	4	24.5	12.5	0.0	0.0	R
	5	33.5	13.8	0.0	0.0	R
	6	28.5	15.6	170.0	5.0	S
	7	29.5	15.5	55.0	4.0	S
	8	32.1	13.0	0.0	0.0	R
	9	37.0	12.5	0.0	0.0	R
	10	37.5	14.7	0.0	0.0	R
	11	32.3	14.2	0.0	0.0	R
	12	29.3	14.7	0.0	0.0	R
	13	28.0	16.1	0.0	0.0	R
	14	30.5	19.0	0.0	0.0	R
	15	28.5	13.0	105.0	5.0	S
	16	30.0	15.0	0.0	0.0	R
	17	34.1	13.5	0.0	0.0	R
<b>8 No'lu F3</b>	1	33.2	21.1	66.0	5.0	S
	2	32.5	17.7	0.0	0.0	R
	3	33.5	14.1	0.0	0.0	R
	4	31.6	18.1	0.0	0.0	R
	5	28.5	19.4	0.0	0.0	R
	6	38.5	15.1	680.0	5.0	S
	7	31.0	15.6	111.0	5.0	S
	8	32.0	17.5	1.0	1.0	R
	9	41.5	16.1	5.0	1.0	R
	10	32.5	17.8	0.0	0.0	R
	11	33.5	20.5	0.0	0.0	R
	12	32.7	15.0	65.0	4.0	S
	13	34.3	14.7	0.0	0.0	R
	14	34.5	14.1	0.0	0.0	R
	15	35.5	17.0	0.0	0.0	R
<b>9 No'lu F3</b>	1	27.5	15.6	0.0	0.0	R
	2	27.5	20.0	2.0	1.0	R
	3	26.8	15.6	2.0	1.0	R
	4	25.4	20.5	0.0	0.0	R
	5	31.7	15.7	3.0	2.0	R
	6	29.6	16.7	0.0	0.0	R
	7	23.5	15.0	0.0	0.0	R

	8	26.6	12.6	0.0	0.0	R
	9	23.5	13.5	0.0	0.0	R
	10	29.5	17.5	0.0	0.0	R
	11	29.1	17.1	0.0	0.0	R
	12	29.5	15.4	0.0	0.0	R
	13	30.5	16.8	0.0	0.0	R
	14	28.1	21.5	0.0	0.0	R
	15	27.0	17.6	3.0	2.0	R
<b>10 No'lu F3</b>	1	32.5	16.5	0.0	0.0	R
	2	29.5	17.1	0.0	0.0	R
	3	36.2	17.1	0.0	0.0	R
	4	26.5	14.4	0.0	0.0	R
	5	32.0	13.5	8.0	2.0	R
	6	34.4	14.6	0.0	0.0	R
	7	33.6	14.5	196.0	5.0	S
	8	31.4	17.0	5.0	1.0	R
	9	35.4	15.6	0.0	0.0	R
	10	29.8	17.3	130.0	5.0	S
	11	21.2	13.1	0.0	0.0	R
	12	30.8	15.1	0.0	0.0	R
	13	28.6	13.4	0.0	0.0	R
	14	38.0	16.2	13.0	3.0	S
	15	35.4	13.2	0.0	0.0	R
	16	30.6	18.5	220.0	5.0	S
<b>11 No'lu F3</b>	1	33.2	24.3	0.0	0.0	R
	2	22.5	19.1	0.0	0.0	R
	3	34.9	16.6	0.0	0.0	R
	4	29.6	15.0	300.0	5.0	S
	5	35.0	25.9	0.0	0.0	R
	6	25.6	22.0	995.0	5.0	S
	7	28.5	20.6	0.0	0.0	R
	8	32.5	17.5	1.0	1.0	R
	9	24.1	19.7	0.0	0.0	R
	10	33.7	13.6	15.0	3.0	S
	11	36.2	17.8	0.0	0.0	R
	12	38.0	14.5	500.0	5.0	S
	13	29.1	21.2	3.0	2.0	R
	14	31.7	17.3	1.0	1.0	R
	15	31.8	30.2	0.0	0.0	R
	16	26.0	18.1	2.0	1.0	R
	17	31.5	26.0	1.0	1.0	R
<b>12 No'lu F3</b>	1	25.0	14.6	0.0	0.0	R
	2	29.6	14.0	0.0	0.0	R

	3	27.6	13.0	0.0	0.0	R
	4	34.7	13.6	0.0	0.0	R
	5	31.5	17.0	0.0	0.0	R
	6	36.1	19.5	0.0	0.0	R
	7	29.5	14.2	0.0	0.0	R
<b>13 No'lu F3</b>	1	27.8	16.7	8.0	2.0	R
	2	24.2	15.6	3.0	2.0	R
	3	25.2	16.1	0.0	0.0	R
	4	25.6	16.5	0.0	0.0	R
	5	27.5	20.7	1.0	1.0	R
	6	26.8	15.2	760.0	5.0	S
	7	25.4	15.2	0.0	0.0	R
	8	26.7	20.7	0.0	0.0	R
	9	20.5	22.5	0.0	0.0	R
	10	22.3	13.5	0.0	0.0	R
	11	28.5	28.0	0.0	0.0	R
	12	23.6	16.4	0.0	0.0	R
	13	21.4	15.4	0.0	0.0	R
	14	21.2	14.3	135.0	5.0	S
	15	20.4	25.5	97.0	4.0	S
	16	23.2	15.4	60.0	4.0	S
	17	23.7	16.0	0.0	0.0	R
<b>14 No'lu F3</b>	1	30.7	21.5	0.0	0.0	R
	2	30.1	11.6	0.0	0.0	R
	3	33.2	17.3	0.0	0.0	R
	4	35.6	18.7	0.0	0.0	R
	5	33.2	15.2	0.0	0.0	R
	6	28.1	14.6	0.0	0.0	R
	7	34.1	14.5	0.0	0.0	R
	8	33.0	15.6	0.0	0.0	R
	9	32.8	22.8	0.0	0.0	R
	10	31.8	20.1	0.0	0.0	R
	11	31.2	15.6	0.0	0.0	R
	12	29.4	17.2	0.0	0.0	R
	13	35.0	18.0	0.0	0.0	R
	14	27.8	13.2	0.0	0.0	R
	15	33.2	19.7	0.0	0.0	R
	16	38.6	21.8	0.0	0.0	R
	17	28.6	20.7	0.0	0.0	R
<b>15 No'lu F3</b>	1	41.8	18.5	285.0	5.0	S
	2	33.6	18.1	97.0	4.0	S
	3	36.2	13.6	210.0	5.0	S
	4	40.3	16.5	350.0	5.0	S

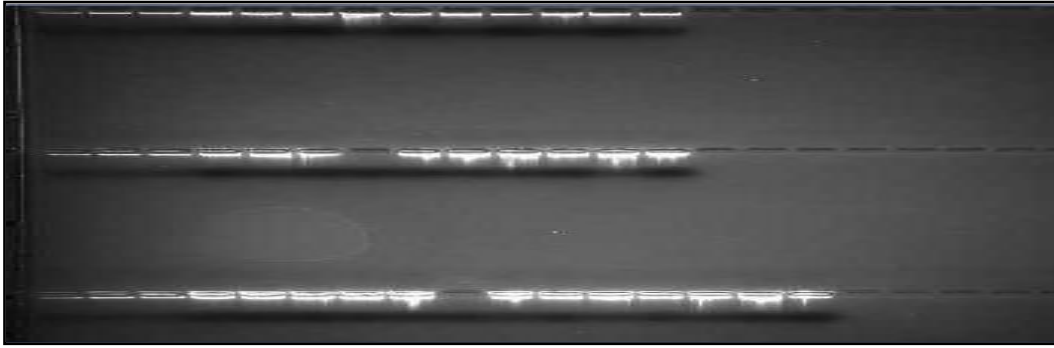
	5	37.6	15.6	455.0	5.0	S
	6	36.4	19.2	380.0	5.0	S
	7	36.7	16.6	102.0	5.0	S
	8	45.8	15.7	125.0	5.0	S
	9	42.5	15.6	380.0	5.0	S
	10	39.6	14.8	80.0	4.0	S
	11	42.7	15.8	180.0	5.0	S
	12	32.1	19.2	285.0	5.0	S
	13	42.5	28.7	215.0	5.0	S
	14	43.7	18.0	120.0	5.0	S
	15	42.8	18.5	65.0	4.0	S
	16	40.6	16.5	0.0	0.0	R
	17	29.7	14.6	85.0	4.0	S
<b>16 No'lu F3</b>	1	27.5	24.6	0.0	0.0	R
	2	28.6	16.2	0.0	0.0	R
	3	30.6	18.5	2.0	1.0	R
	4	19.6	15.1	0.0	0.0	R
	5	31.0	15.6	0.0	0.0	R
	6	28.3	11.7	0.0	0.0	R
	7	21.8	19.8	0.0	0.0	R
	8	34.0	14.5	0.0	0.0	R
	9	27.4	15.5	0.0	0.0	R
	10	20.2	29.6	0.0	0.0	R
	11	30.8	16.2	176.0	5.0	S
	12	22.7	21.6	46.0	4.0	S
	13	21.0	21.8	0.0	0.0	R
	14	20.3	17.5	0.0	0.0	R
<b>17 No'lu F3</b>	1	30.7	14.5	45.0	4.0	S
	2	22.4	13.5	0.0	0.0	R
	3	35.7	15.2	1.0	1.0	R
	4	23.5	13.5	0.0	0.0	R
	5	29.5	14.4	56.0	4.0	S
	6	27.5	15.4	5.0	2.0	R
	7	38.0	14.7	0.0	0.0	R
	8	34.0	18.5	0.0	0.0	R
	9	25.7	15.6	0.0	0.0	R
	10	30.8	14.1	0.0	0.0	R
	11	27.5	12.6	0.0	0.0	R
	12	32.5	23.5	0.0	0.0	R
	13	26.5	16.1	0.0	0.0	R
	14	23.5	13.6	0.0	0.0	R
	15	33.3	18.6	0.0	0.0	R
	16	28.0	14.6	180.0	5.0	S

	17	32.6	12.5	0.0	0.0	R
	18	34.0	12.0	95.0	4.0	S
	19	38.0	15.3	0.0	0.0	R
	20	35.8	14.5	0.0	0.0	R
	21	29.5	16.8	0.0	0.0	R

## 2. Moleküler Genetik Analizler

### 2.1. Biber doku örneklerinden DNA izolasyonu sonuçları

Ayrıca, rapor döneminde, çalışmaların bir sonraki iş paketinde yer alan haritalama çalışmalarına da başlanmıştır. Bu amaçla, projede dayanıklı (Charleston Belle ve Carolina Wonder) ve duyarlı (AZN-1) materyal olarak kullanılan birber genotiplerine ait DNA'lar çıkarılmıştır. DNA kalitelerinin belirlenmesi için elde edilen DNA'lar agaroz jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir (Şekil 7). Ayrıca, izole edilen DNA'ların konsantrasyonları Nanodrop kullanılarak belirlenmiştir.



Şekil 7. Charleston Belle, Carolina Wonder ve AZN-1 biber genotiplerinden izole edilen DNA'ların %3'lük agaroz jelde görüntülenmesi.

Tablo 8. İzole edilen Azn, CB ve CW biber DNA'larının Nano drop ölçümlerindeki konsantrasyonları

Örnek	ng/ul	260/280	260/230	Örnek	ng/ul	260/280	260/230
1	542.38	1.77	1.21	16	318.36	1.70	1.36
2	631.99	1.69	1.49	17	95.61	1.71	0.85
3	67.17	1.75	0.84	18	823.67	1.45	1.06
4	206.55	1.67	1.00	19	71.69	1.73	1.04
5	421.34	1.74	1.40	20	140.28	1.62	0.89
6	425.28	1.53	1.24	21	105.55	1.61	1.10
7	462.38	1.51	1.26	22	54.16	1.69	0.91
8	519.33	1.01	1.96	23	214.50	1.75	1.39
9	85.67	1.67	1.04	24	137.42	1.62	0.99
10	637.56	1.66	1.38	25	489.85	1.55	1.19
11	1194.39	1.59	1.11	26	401.42	1.70	0.76
12	677.12	1.81	1.13	27	112.82	1.90	0.32
13	413.01	1.53	1.05	28	136.68	1.79	0.89
14	289.09	1.58	1.14	29	105.29	1.69	0.88
15	216.70	1.69	1.60	30	333.13	1.42	0.91
31	129.44	1.64	0.95	42	84.18	1.69	1.01
32	63.81	1.82	1.13	43	82.47	1.80	1.15

33	19.80	1.58	1.24	44	102.77	1.75	0.96
34	248.13	1.64	0.87	45	41.04	1.62	0.70
35	159.17	1.70	0.85	46	58.47	1.67	0.73
36	117.48	1.71	1.00	47	268.11	1.10	1.13
37	87.33	1.67	1.15	48	101.38	2.00	0.74
38	70.10	1.70	1.14	49	415.48	1.71	1.21
39	65.31	1.76	1.12	50	60.34	1.82	1.04
40	123.11	1.70	0.70				
41	138.62	1.65	0.97				

Haritalama çalışmaları için biber spesifik SSR markörleri elde edilmiştir. Fazari ve ark. (2012) yayınladıkları son çalışmada N geni ve Me-3 geni arasında genetik bağlantı olduğunu rapor etmektedir. Me-3 geni biber genomunda 9. Kromozomda yer almaktadır. Bu nedenle 9. Kromozomun Me-3 bölgesindeki markörler öncelikli olarak temin edilmiştir.

Daha önceki rapor döneminde kök-uru nematoduna dayanıklı (Carolina Wonder) ve duyarlı (AZN-1) biber çeşitlerinin melezlenmesi sonucu F1 generasyonu oluşturulmuştur. Nematod testlemeleri sonucunda bütün F1 lerin dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Dayanıklı bulunan bu F1 bitkilerinin kendilenmesi sonucu nematod dayanıklılığı sağlayan N geni bakımından açılım gösteren F2 populasyonları oluşturulmuştur. Elde edilen bu F2 populasyonuna ait 256 birey *M. incognita* ırk 2 izolatu kullanılarak patolojik testlemelere alınmıştır. Yapılan analizler sonucunda testlemeye alınan F2 populasyonunun %75.4'ünün dayanıklı (kök-uru oluşturma endeks miktarlarına göre 0 ile 2 gallenme arasında) ve %24,6'sının da duyarlı (kök-uru oluşturma endeksi 2 den fazla) olduğu ortaya konulmuştur. N geninin dominant kalıtım gösteren bir gen olduğu bilinmektedir ve projemizde elde edilen sonuçlar bilinen bu bilgiyi doğrulamıştır. Segregasyon oranı Chi-square testine göre uyumluluk göstermektedir (p değeri: 0,88). N genini haritalamaya yönelik çalışmalar için öncelikle dayanıklı ve duyarlı ebeveynlerde 340 adet SSR ve CAPs markörleri kullanılarak polimorfizm taraması yapılmıştır. Bu çalışmada kullanılan markörler liste halinde Tablo 9'da verilmiştir. Polimorfizm çalışmasına ait bazı sonuçlar Şekil 8'de verilmiştir.

Tablo 9. Polimorfizm taramasından kullanılan primer listesi

SSR PRIMERS						
HpmsE001	HpmsE027	HpmsE053	HpmsE089	HpmsE122	HpmsE148	GPMS161
HpmsE002	HpmsE028	HpmsE054	HpmsE091	HpmsE123	HpmsE149	GPMS162
HpmsE003	HpmsE029	HpmsE055	HpmsE093	HpmsE124	GP20095	GPMS163
HpmsE004	HpmsE030	HpmsE056	HpmsE094	HpmsE125	GP20117	GPMS164
HpmsE005	HpmsE031	HpmsE057	HpmsE095	HpmsE126	GPMS100	GPMS165

HpmsE006	HpmsE032	HpmsE058	HpmsE096	HpmsE127	GPMS101	GPMS166
HpmsE007	HpmsE033	HpmsE064	HpmsE097	HpmsE128	GPMS103	GPMS169
HpmsE008	HpmsE034	HpmsE065	HpmsE098	HpmsE129	GPMS104	GPMS171
HpmsE009	HpmsE035	HpmsE066	HpmsE099	HpmsE130	GPMS107	GPMS176
HpmsE010	HpmsE036	HpmsE067	HpmsE100	HpmsE131	GPMS109	GPMS178
HpmsE011	HpmsE037	HpmsE068	HpmsE101	HpmsE132	GPMS111	GPMS181
HpmsE012	HpmsE038	HpmsE069	HpmsE102	HpmsE133	GPMS112	GPMS183
HpmsE013	HpmsE039	HpmsE070	HpmsE103	HpmsE134	GPMS113	GPMS185
HpmsE014	HpmsE040	HpmsE071	HpmsE104	HpmsE135	GPMS117	GPMS186
HpmsE015	HpmsE041	HpmsE072	HpmsE107	HpmsE136	GPMS119	GPMS187
HpmsE016	HpmsE042	HpmsE073	HpmsE108	HpmsE137	GPMS140	GPMS188
HpmsE017	HpmsE043	HpmsE074	HpmsE110	HpmsE138	GPMS141	GPMS189
HpmsE018	HpmsE044	HpmsE078	HpmsE111	HpmsE139	GPMS142	GPMS191
HpmsE019	HpmsE045	HpmsE080	HpmsE112	HpmsE140	GPMS147	GPMS193
HpmsE020	HpmsE046	HpmsE081	HpmsE113	HpmsE141	GPMS150	GPMS194
HpmsE021	HpmsE047	HpmsE082	HpmsE115	HpmsE142	GPMS151	GPMS195
HpmsE022	HpmsE048	HpmsE083	HpmsE116	HpmsE143	GPMS153	GPMS196
HpmsE023	HpmsE049	HpmsE084	HpmsE118	HpmsE144	GPMS154	GPMS197
HpmsE024	HpmsE050	HpmsE086	HpmsE119	HpmsE145	GPMS155	GPMS198
HpmsE025	HpmsE051	HpmsE087	HpmsE120	HpmsE146	GPMS156	GPMS199
HpmsE026	HpmsE052	HpmsE088	HpmsE121	HpmsE147	GPMS157	U221402
4CL	CA516044	CP10061	EPMS369	EPMS416	GPMS159	GPMS1
AA840689	CA516334	CP10081	EPMS372	EPMS417	U217183	GPMS200
AA840692	CA516439	CP10131	EPMS373	EPMS418	EPMS507	GPMS201
AA840739	CA517699	CT232	EPMS374	EPMS419	EPMS514	GPMS202
Actin SR	CA519548	CT253	EPMS376	EPMS420	EPMS538	GPMS203
A-39662	CA523558	CT59	EPMS377	EPMS421	EPMS539	GPMS205
A-39662	CA523715	CT94	EPMS378	EPMS424	EPMS540	GPMS29
asu11	CA523880	E492334	EPMS382	EPMS426	EPMS542	GPMS37
asu2	CA524065	EPMS303	EPMS386	EPMS427	EPMS543	GPMS3
asu5	CA525274	EPMS305	EPMS387	EPMS428	EPMS546	GPMS4

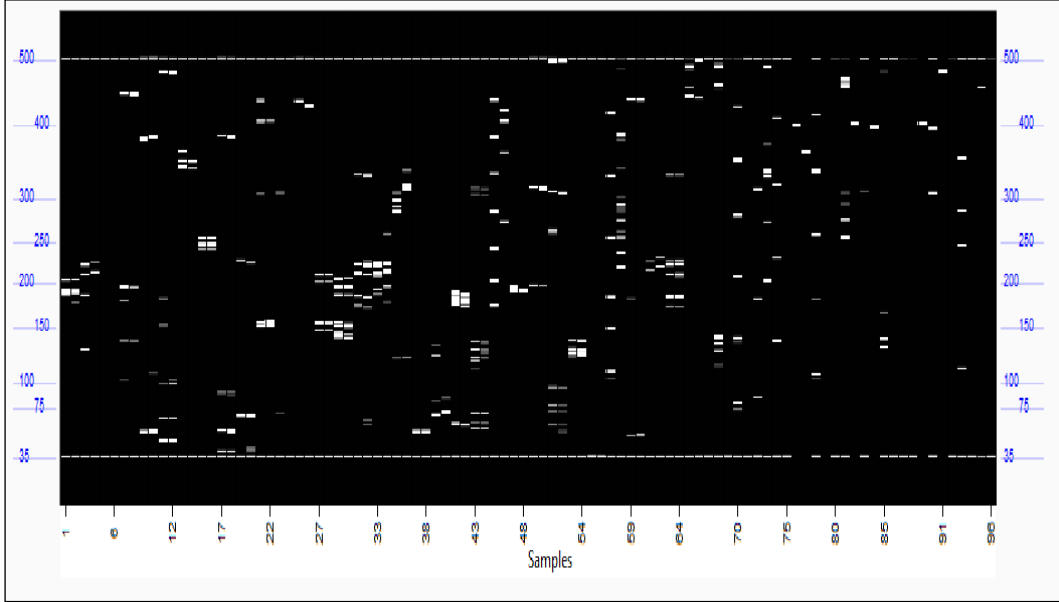


asu7	CA525390	EPMS309	EPMS390	EPMS429	EPMS547	GPMS6
asu9	CA526211	EPMS310	EPMS391	EPMS430	EPMS549	GPMS8
BD76366	CA847460	EPMS316	EPMS395	EPMS438	EPMS554	GPMS93
BM59622	CA847580	EPMS327	EPMS396	EPMS439	GP1017	GSP
BM61028	CACCEL1i	EPMS330	EPMS397	EPMS440	GP1049	Hba181H07
BM61461	CAN130829	EPMS331	EPMS399	EPMS441	GP1078	hp2
BM61910	CaSn-R	EPMS335	EPMS402	EPMS443	GP1102	Hpms1-117
BM62655	CaSn-SR	EPMS340	EPMS404	EPMS446	GP1127	Hpms1-143
BM64867	CB164833	EPMS342	EPMS409	EPMS448	GP20031	Hpms1-165
BM67271	CB164897	EPMS343	EPMS410	EPMS449	GP20036	Hpms2-41
CA514272	cLPT5E7	EPMS345	EPMS411	EPMS451	GP20056	ldh-1
CA514621	CM10	EPMS349	EPMS412	EPMS472	GP20062	Mbol77E18
CA515055	CP10020	EPMS350	EPMS413	EPMS480	GP20064	ovate
CA515275	CP10023	EPMS353	EPMS414	EPMS490	GP20068	P1-P2
CA515649	CP10060	EPMS366	EPMS415	EPMS492	GP20087	Pgm-2
SCAR	Skdh-1	T0408	T0463	TG132	TG517	U223436

Proje kapsamında Haritalama populasyonunun oluşturulduğu anaçlar kullanılarak yapılan polimorfizm çalışmasından 30 civarında markör anaçlar arasında polimorfik bulunmuştur. Bu çalışmalar yapılırken N geninin biber genomundaki pozisyonu gösterildikten sonra sadece dokuzuncu kromozom üzerinde yağunlaşmıştır. Tablo 10 ve Şekil 8'de sadece 9. Kromozom markörleri ile yapılan çalışma sonuçları verilmiştir.

Tablo 10. Biber dokuzuncu kromozomunda bulunan CosII, SSR, SCAR markörleri listesi

Scar	SSCP B54	C2at3g09925
P1-P2	C2at5g06130	Hpms 2-41
ActinFSFR	C2at2g29210	Scar B94
CaSnFS-FR	Scar HM6	GPMS171
Hpms1-3	Scar PM6b	Hpms1-117
ScarCD	Scar HM60	HpmsE0102
CAPS F4R4	Scar Pm6a	HpmsE082
C2at2g37240	SSCP PM5	At5g58410
SSCP-B322	GPMS160	HpmsE025
C2at3g09920	HpmsE094	HpmsE007



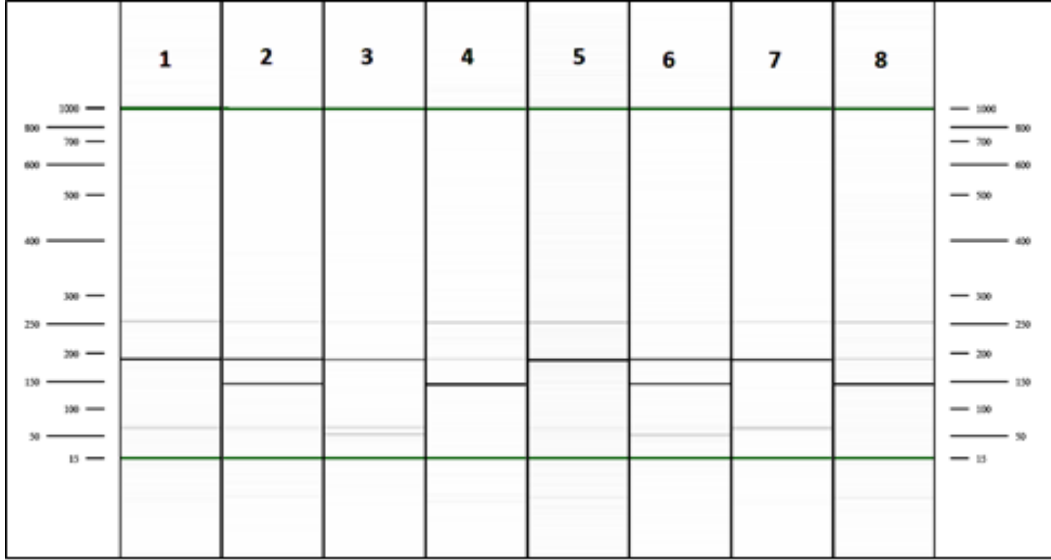
Şekil 8. Fragment Analyser™ Automated CE Sistemi kullanılarak yapılan polimorfizm analizi sonuçları.

Dokuzuncu kromozom da bulunan markörler kullanılarak yapılan polimorfizm belirleme çalışmaları sonucunda 12 SSR ve SCAR markörü polimorfik bulunmuştur. Polimorfik bulunan 9. Kromozom spesifik markör listesi Tablo 11’de verilmiştir.

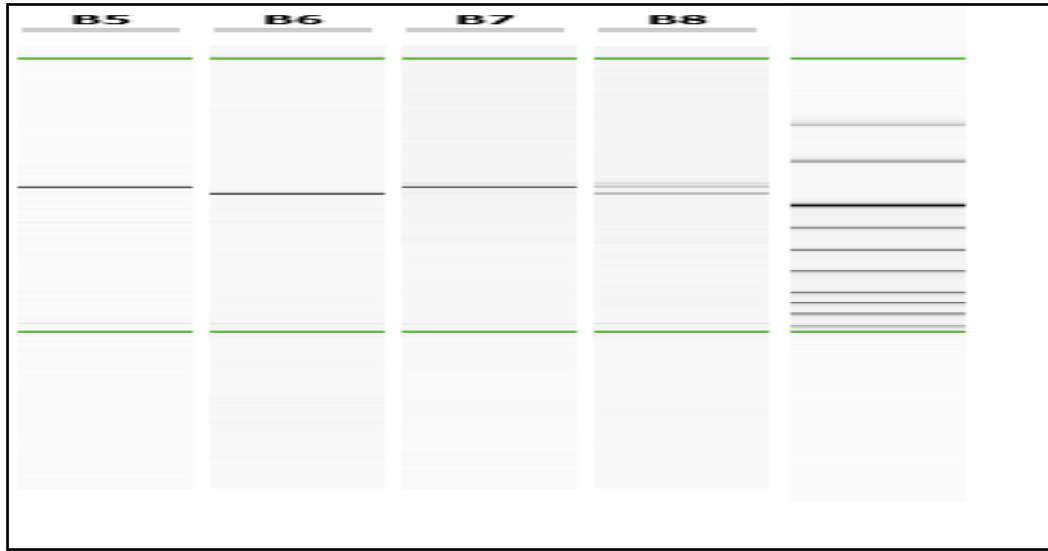
Tablo 11. Polimorfik markör listeri

ScarN	Hpms117
ScarPM6a	Hpms1-3
ScarPM6b	SSCPB54
At5g06130	CapsF4R4
SSCPB322	Epms472
SSCPPM5	CaSnFR

Haritalama çalışmalarında kullanılmak üzere dayanıklı ve duyarlı anaçlarla yapılan surveyleme çalışmaları sonucunda polimorfik bulunan markörler F2 popülasyonuna uygulanmıştır. Bu amaç için nematod ile testlenen 256 bitki arasından seçilen en dayanıklı ve duyarlı 10 ar genotipe ait DNA lar aynı miktarda karıştırılarak dayanıklı ve duyarlı DNA havuzları oluşturulmuştur. Anaçlarla yapılan polimorfizm testlemesi sonucu polimorfik bulunan markörler Bulked segregant analizi (BSA) için kullanılmıştır. Yapılan BSA testlemeleri sonucunda ScarPM6a, ScarN ve ScarPM6b markörleri QIAxcel Capillary Electrophoresis sisteminde polimorfizm göstermiştir (Şekil 9, 10).



Şekil 9. Bulked segregant analizi sonucunda polimorfik bulunan markörlerin kapillar elektroforez görüntüleri. ScarPM6a markörü BSA testlemesi sonucu. 1 ve 5: AZN-1, 2 ve 6: Carolina Wonder, 3 ve 7: hassas F2 bireyleri havuz DNA'sı, 4 ve 8: dayanıklı F2 bireyleri havuz DNA'sı.



Şekil 10. ScarN markörü BSA testlemesi Capillary sonucu. B5: AZN-1, B6: Carolina Wonder, B7: hassas F2 bireyleri havuz DNA, B8: dayanıklı F2 bireyleri havuz DNA

BSA analizi sonucunda doğrulanan ScarPM6a, ScarN ve ScarPM6b markörleri kullanılarak elde edilen genotipik veriler ve 256 bitkiden oluşan F2 populasyonu kullanılarak yapılan nematod testlemesi sonucunda elde edilen fenotipik bilgiler JoinMap bağlantı haritalama programı kullanılarak kısmi bir genetik harita oluşturuldu (Şekil 10). Oluşturulan haritada ScarPM6a markörünün N genine 3.6 cM, ScarPm6b markörünün 10.2 cM ve ScarN markörünün 22.6 cM yakınında olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmanın devamında N genine daha yakın ve MAS

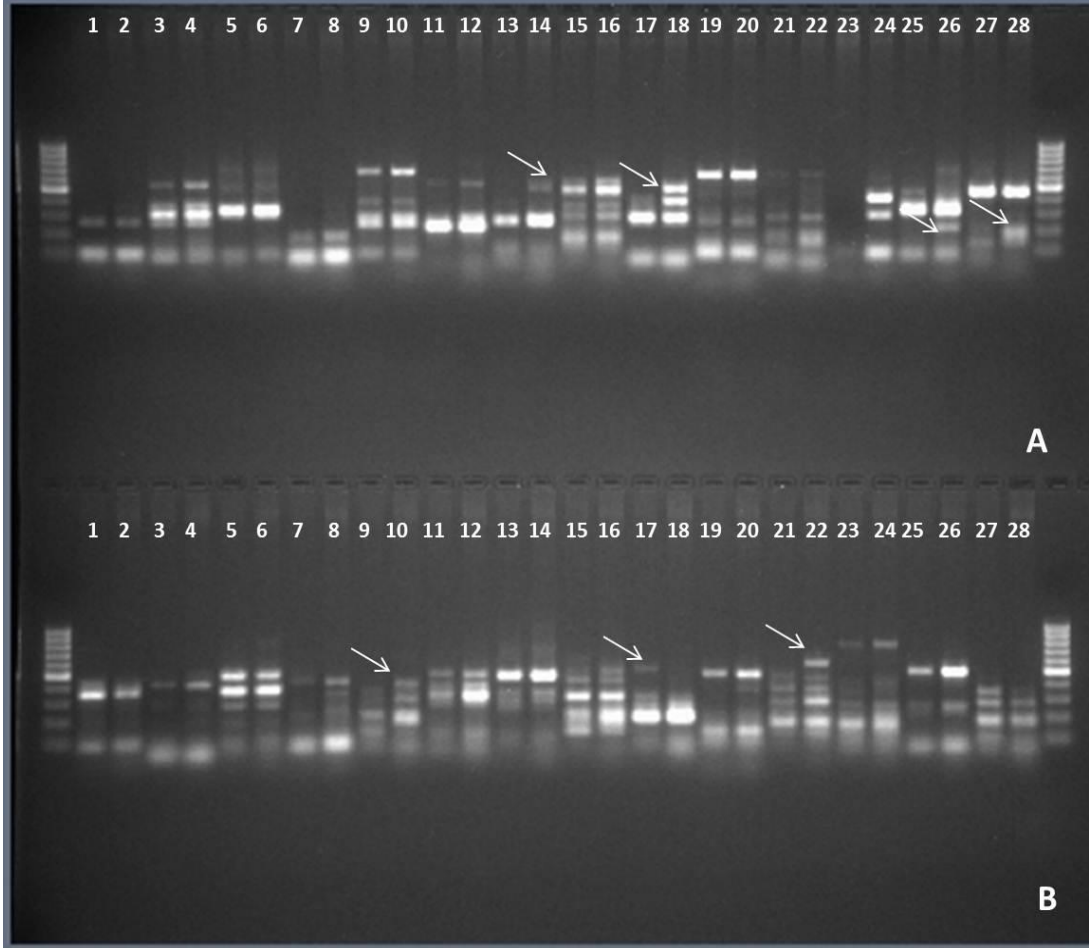


(marker assisted selection) da kullanılabilir yeni markörler belirlenmesi gerekmektedir.

## **2.2. Haritalama Popülasyonu Ebeveynleri Arasında Polimorfik SRAP Markörlerinin Belirlenmesi**

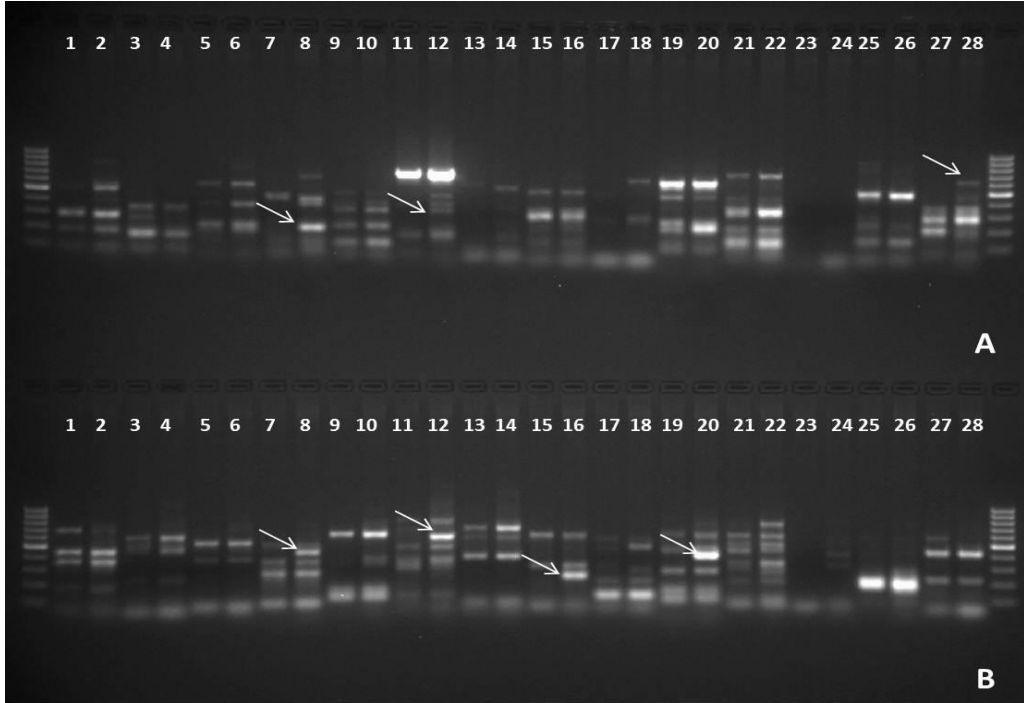
Nematoda dayanıklı biber çeşidi Carolina Wonder (CW) ve duyarlı çeşit AZN-1 genotipleri arasında polimorfizm gösteren markörlerin sayısının artırılması ve bu şekilde N geninin haritalanma çözünürlüğünün yükseltmesi hedeflenmektedir. Bu amaca yönelik olarak, SRAP (dizi ile ilişkili çoğaltma polimorfizmi) ve SNP (tek nükleotit polimorfizmi) markör sistemleri kullanılmıştır. SRAP markör sistemi, bitki genlerinin açık okuma bölgelerini (ORF) hedefleyen primerlerin kombinasyonlar halinde kullanılması ile, farklı bitki türlerinde polimeraz zincir reaksiyonu ürünü üretebilen, dominant, tekrar edilebilirliği yüksek bir markör sistemidir. Primer çiftlerinin, farklı bitki genotiplerinde ürettiği farklı bantlar, polimorfizmi oluşturmaktadır. Bu proje kapsamında, N geninin haritalanmasında kullanılan popülasyonun ebeveynleri olan CW ve AZN-1'e ait DNA örnekleri kullanılarak SRAP primer kombinasyonları test edilmiştir ve polimorfik bulunan kombinasyonlar, haritalama popülasyonuna uygulanmak üzere belirlenmiştir. SRAP markör sisteminin yanı sıra, laboratuvarımızca geliştirilmiş olan biber bitkisine özel SNP markörleri, CW ve AZN-1 genotiplerinde testlenmiştir. SNP markörlerinin genotiplenmesinde, CAPS (Kesilmiş çoğaltılmış polimorfik dizi) markör sistemi kullanılmıştır. CAPS yöntemi ile SNP genotipleme, SNP'leri içeren DNA parçalarının PCR ile çoğaltılması, SNP'lere özel belirlenmiş DNA kesim enzimleri ile PCR ürünlerinin kesilmesi ve SNP alellerinden kaynaklı kesim profili farklılıklarının belirlenmesine dayanmaktadır.

SRAP primer kombinasyonları ile üretilen PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. SRAP PCR ürünleri ve polimorfik bulunan primer kombinasyonları Şekil 11'de verilmektedir.



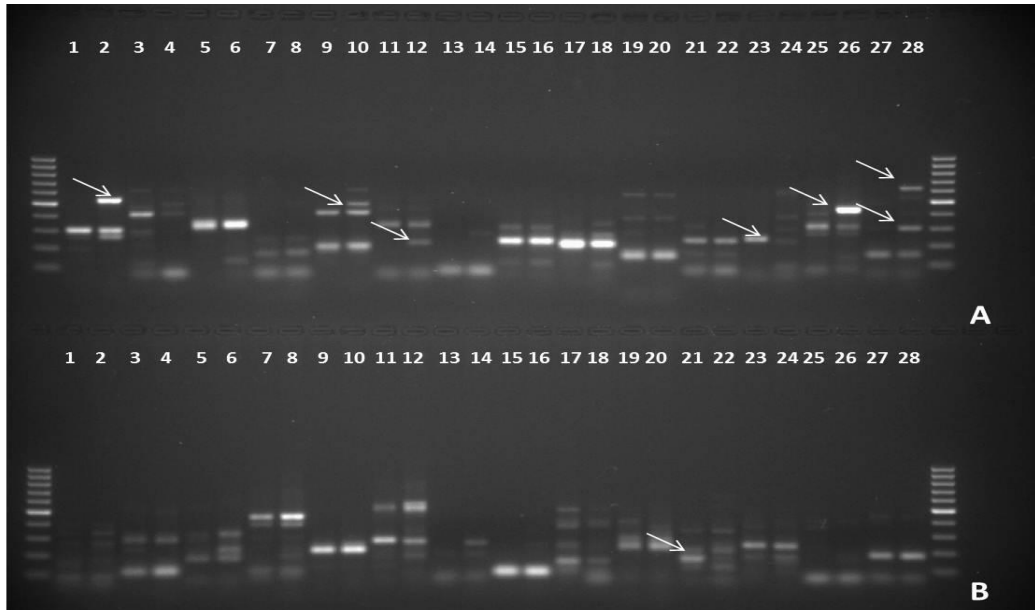
**Şekil 11.** EM1 ve EM2 SRAP primerlerinin ME1-14 SRAP primerleri ile kombinasyonu ile elde edilen SRAP markör profilleri. A: EM1 primerinin 14 adet ME primeri (ME1-14) ile kombinasyonunu gösteren agaroz jel elektroforezi; B: EM2 primerinin 14 adet ME primeri (ME1-14) ile kombinasyonunu gösteren agaroz jel elektroforezi; A ve B jellerinde her bir primer kombinasyonu için birinci genotip AZN-1, ikinci genotip CW'dir.

EM1 SRAP primeri, ME7, ME9, ME13 ve ME14 primerleri ile kombinasyon halinde AZN-1 ve CW genotipleri arasında polimorfik bant üretmektedir. EM2 primeri, ME5, ME9 ve ME11 primerleri ile kombinasyon halinde, polimorfik bant üretmektedir. Polimorfik bulunan bantlar, ok işareti ile Şekil 11 'de gösterilmektedir.



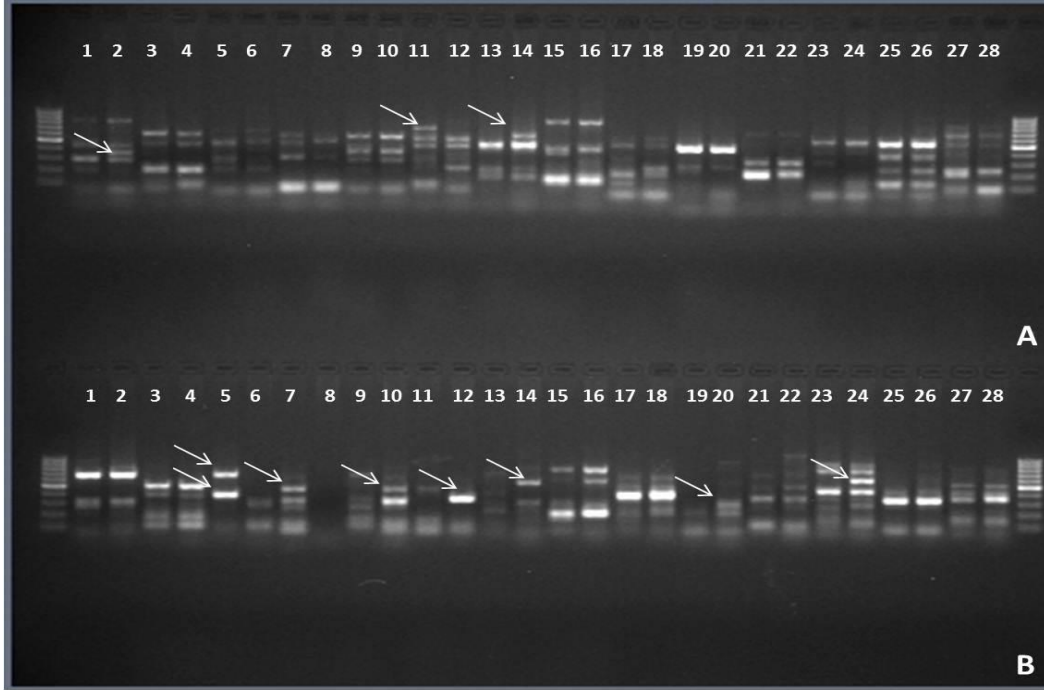
**Şekil 12.** EM3ve EM4 SRAP primerlerinin ME1-14 SRAP primerleri ile kombinasyonu ile elde edilen SRAP markör profilleri. A: EM3primerinin 14 adet ME primeri (ME1-14) ile kombinasyonunu gösteren agaroz jel elektroforezi; B: EM4primerinin 14 adet ME primeri (ME1-14) ile kombinasyonunu gösteren agaroz jel elektroforezi; A ve B jellerinde her bir primer kombinasyonu için birinci genotip AZN-1, ikinci genotip CW' dir.

EM3 SRAP primeri, ME4, ME6 ve ME14 primerleri ile kombinasyon halinde AZN-1 ve CW genotipleri arasında polimorfik bant üretmektedir. EM4 SRAP primeri, ME4, ME6, ME8 ve ME10 primerleri ile kombinasyon halinde, polimorfik bant üretmektedir. Polimorfik bulunan bantlar, Şekil 12'de ok işareti ile gösterilmektedir.



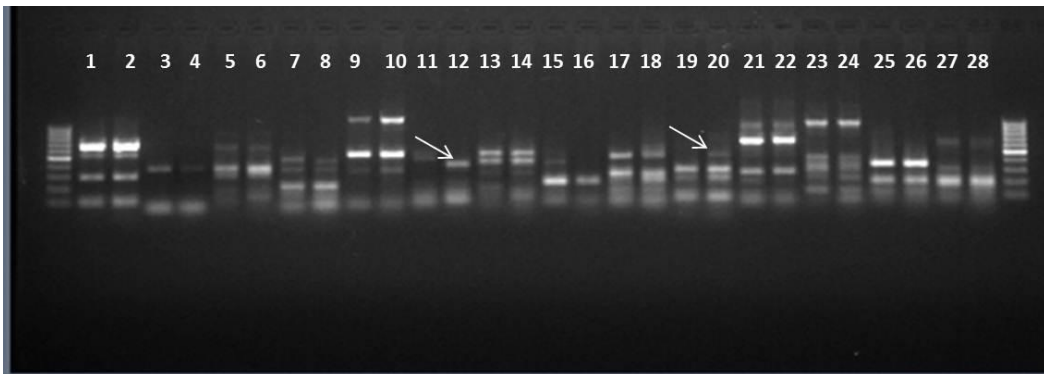
**Şekil 13.** EM5ve EM6 SRAP primerlerinin ME1-14 SRAP primerleri ile kombinasyonu ile elde edilen SRAP markör profilleri. A: EM5 primerinin 14 adet ME primeri (ME1-14) ile kombinasyonunu gösteren agaroz jel elektroforezi; B: EM6 primerinin 14 adet ME primeri (ME1-14) ile kombinasyonunu gösteren agaroz jel elektroforezi; A ve B jellerinde her bir primer kombinasyonu için birinci genotip AZN-1, ikinci genotip CW' dir.

EM5 SRAP primeri, ME1, ME5, ME6, ME12, ME13 ve ME14 primerleri ile kombinasyon halinde AZN-1 ve CW genotipleri arasında polimorfik bant üretmektedir. EM6 SRAP primeri, ME11 primeri ile kombinasyon halinde, polimorfik bant üretmektedir. Polimorfik bulunan bantlar, Şekil 13'de ok işareti ile gösterilmektedir.



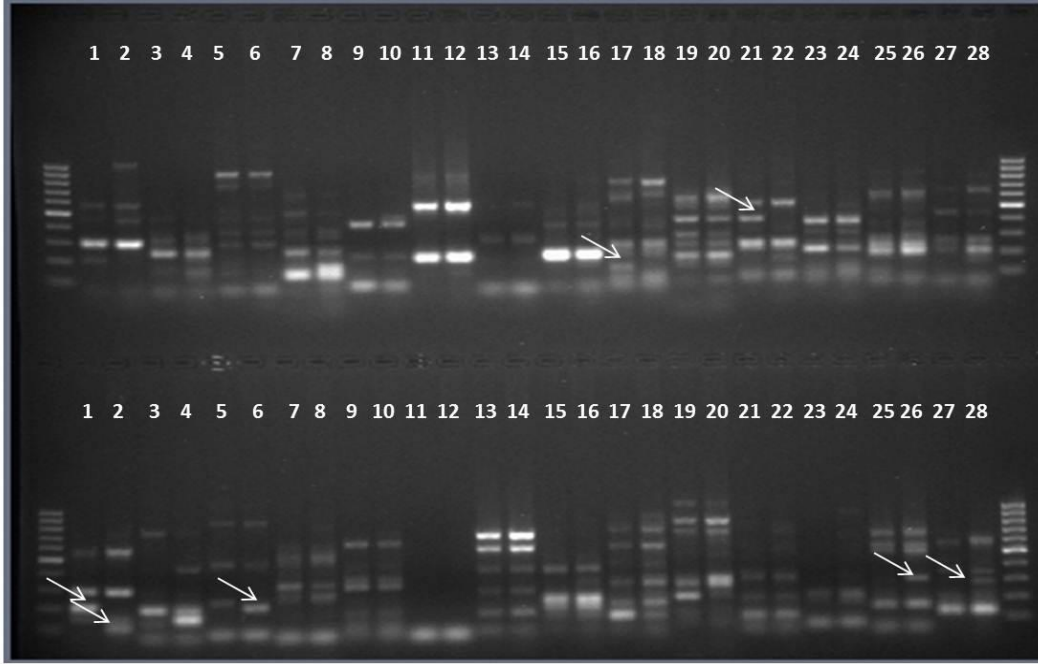
**Şekil 14.** EM11ve EM12 SRAP primerlerinin ME1-14 SRAP primerleri ile kombinasyonu ile elde edilen SRAP markör profilleri. A: EM11 primerinin 14 adet ME primeri (ME1-14) ile kombinasyonunu gösteren agaroz jel elektroforezi; B: EM12 primerinin 14 adet ME primeri (ME1-14) ile kombinasyonunu gösteren agaroz jel elektroforezi; A ve B jellerinde her bir primer kombinasyonu için birinci genotip AZN-1, ikinci genotip CW'dir.

EM11 SRAP primeri, ME1, ME6 ve ME7 primerleri ile kombinasyon halinde AZN-1 ve CW genotipleri arasında polimorfik bant üretmektedir. EM12 SRAP primeri, ME3, ME4, ME5, ME6, ME7, ME10 ve ME12 primerleri ile kombinasyon halinde, polimorfik bant üretmektedir. Polimorfik bulunan bantlar, Şekil 14'de ok işareti ile gösterilmektedir.



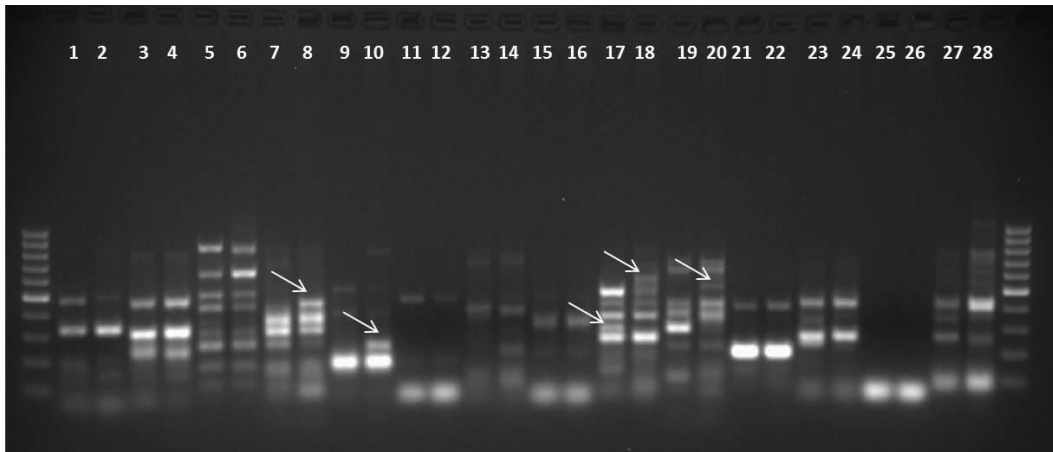
**Şekil 15.** EM13 SRAP primerinin ME1-14 SRAP primerleri ile kombinasyonu ile elde edilen SRAP markör profilleri. Her bir primer kombinasyonu için birinci genotip AZN-1, ikinci genotip CW'dir.

EM13 SRAP primeri ME6 ve ME10 primerleri ile kombinasyon halinde AZN-1 ve CW genotipleri arasında polimorfik bant üretmektedir. Polimorfik bantlar, Şekil 15'de ok işareti ile gösterilmektedir.



**Şekil 16.** EM14ve EM15 SRAP primerlerinin ME1-14 SRAP primerleri ile kombinasyonu ile elde edilen SRAP markör profilleri. A: EM14 primerinin 14 adet ME primeri (ME1-14) ile kombinasyonunu gösteren agaroz jel elektroforezi; B: EM15 primerinin 14 adet ME primeri (ME1-14) ile kombinasyonunu gösteren agaroz jel elektroforezi; A ve B jellerinde her bir primer kombinasyonu için birinci genotip AZN-1, ikinci genotip CW'dir.

EM14 SRAP primeri, ME9 ve ME11 primerleri ile kombinasyon halinde AZN-1 ve CW genotipleri arasında polimorfik bant üretmektedir. EM15 SRAP primeri, ME1, ME3, ME13, ve ME14 primerleri ile kombinasyon halinde, polimorfik bant üretmektedir. Polimorfik bulunan bantlar, Şekil 16'da ok işareti ile gösterilmektedir.



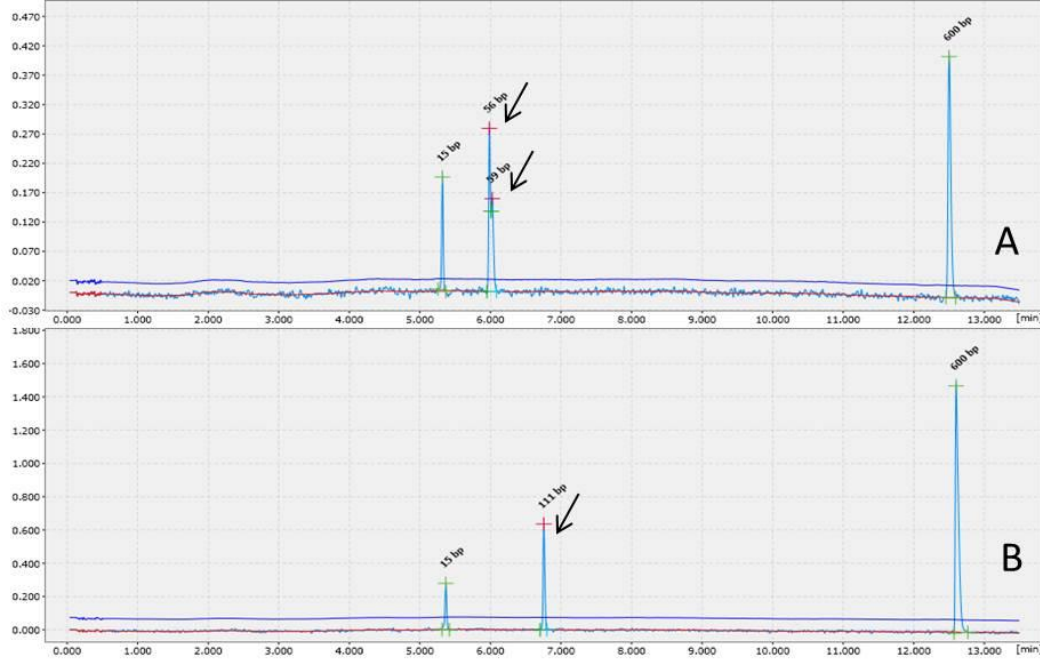
**Şekil 17.** EM17 SRAP primerinin ME1-14 SRAP primerleri ile kombinasyonu ile elde edilen SRAP markör profilleri. Her bir primer kombinasyonu için birinci genotip AZN-1, ikinci genotip CW'dir.

EM17 SRAP primeri ME4, ME5, ME9 ve ME10 primerleri ile kombinasyon halinde AZN-1 ve CW genotipleri arasında polimorfik bant üretmektedir.



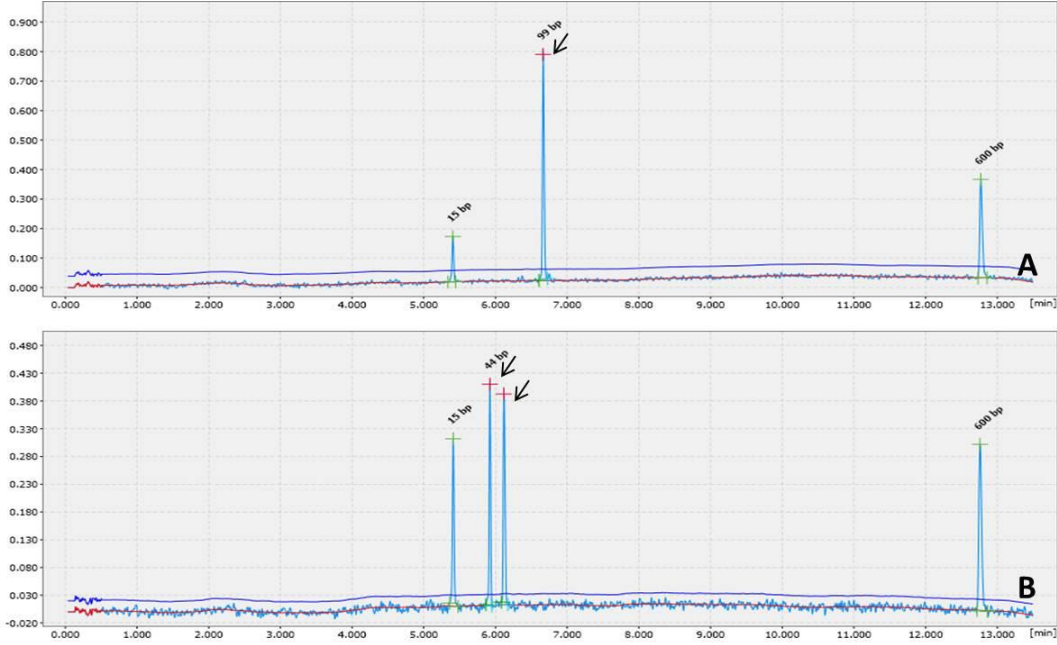
## Haritalama Popülasyonu Ebeveynleri Arasında Polimorfik SNP Markörlerinin Belirlenmesi

SNP'lerin bulunduğu gen bölgelerini çoğaltan primer çiftleri ile elde edilen PZR ürünleri, CAPS analizine tabi tutulmuş, böylece haritalama popülasyonu ebeveynleri arasında polimorfizm gösteren SNP'ler belirlenmiştir. CAPS profilleri, kapiler elektroforez sistemi kullanılarak görüntülenmiştir (Şekil 18,19).



**Şekil 18.** AZN-1 ve CW genotiplerinin SNP1 CAPS profilleri; A: AZN-1'e ait CAPS profilinin kapiler elektroferogramı; B: CW'a ait CAPS profilinin kapiler elektroferogramı.

AZN-1 genotipi, SNP12 konumunda A alelini homozigot olarak taşımaktadır. CW genotipi ise, aynı konum için G alelini homozigot olarak taşımaktadır. İki genotipin SNP alellerindeki farklılık, BsmAI enzimi restriksiyon profillerine yansımakta, böylece CAPS analizi ile, SNP1 lokusu genotiplenmektedir (Şekil 18).

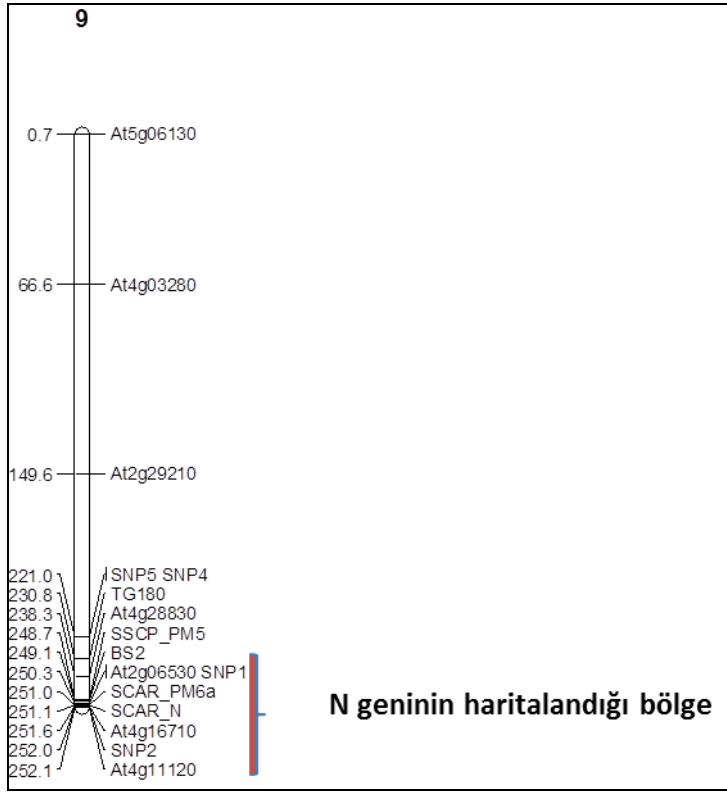


**Şekil 19.** AZN-1 ve CW genotiplerinin SNP2 CAPS profilleri; A: AZN-1'e ait CAPS profilinin kapiler elektroferogramı; B: CW'a ait CAPS profilinin kapiler elektroferogramı.

AZN-1 genotipi, SNP14 konumunda T alelini homozigot olarak taşımaktadır. CW genotipi ise, aynı konum için C alelini homozigot olarak taşımaktadır. İki genotipin SNP alellerindeki farklılık, MluCI enzimi restriksiyon profillerine yansımakta, böylece CAPS analizi ile, SNP14 lokusu genotiplenmektedir (Şekil 19).

Haritalama popülasyonu ebeveynleri arasında polimorfik SRAP markörlerinin belirlenmesi çalışması sonucunda, 238 adet SRAP kombinasyonu, her iki ebeveyne ait DNA örnekleri kullanılarak test edilmiş, toplam 47 adet polimorfik SRAP bandı tespit edilmiştir. SRAP markörlerinin yanı sıra, çalışmada dört adet biber genomuna özel SNP markörü, ebeveynler arasında polimorfik bulunmuştur. Polimorfik bulunan SRAP ve SNP markörlerinin haritalama popülasyonuna uygulanması ve verilerin bağlantı analizine tabi tutulması ile, N geninin haritalama çözünürlüğünün artırılması hedeflenmektedir.

## Biber Genomuna özel SNP markörlerinin Geliştirilmesi ve Haritalanması:



Şekil 20 Geliştirilen SNP markörleri ve N geni ile ilişkilendirilmiş markörlerden oluşturulmuş gen haritası.

Biber genomuna ait dizilerin domates SNP markör haritası ile birlikte ele alınarak incelenmesi sonucu, N geninin bulunduğu bölgeye özel olarak 5 adet SNP markörü geliştirilmiştir. Bu SNP markörlerinden 4 tanesi N geninin bulunduğu kümede haritalanabilmiştir. “SNP2” markörünün, geliştirilen diğer SNP markörlerine göre N genine daha yakın olduğu tespit edilmiştir. Geliştirilen SNP markörlerine ait diziler ve SNP alleli aşağıda belirtilmiştir.

### SNP1:

```
caacgtagtggcactgggttcattgaaccattatctcgacgcaaatcataaattttgtgcaaaaacacacta
aaattgcaataaatagtaggtatgaaccataatfttaaaaatacagtgggatcaatcctaagaatcttgacaac
tgcacacataaggattaaatccggatctgcctctgttttggtgctgtaagggaccaaatacgtgtcctgataatga
tttgatctcctcattcagaacgtctaggcactggcaaatggctgcacaaaaaatatgctgtgtaatgattgattga
gagttcctaatatggttaacttcagttgcataatattggtgtcttgaagactcagttgttccaaactctttttctttct
caaatactcaaaatgttattattggtatcagactttgaaatcaacacaagcaatgggtgaagcgatgaaaggtgt
tacaac
```

## SNP2:

GATGGATGATAAAAATGGTCACCAGCCATCCCCTTCATTGCTTCCTTTTGGAT  
GTCCTTCGATACTTAGGGCGACAAGAGTCATTGTATTCCAACCTTTTCACTTAG  
TGCTTCATGTTCTTCTGATGCCTCGACGGATTCATATCACAGCAGTGCTTCA  
ACTGGTAGGATATATAGAATGAATAGTACCTCAAGCAGAAGGAAGCATTGG  
CGTCCAAGTCCAAAAGGATAGTTTCAGATGATATATCAGACTCTTCAATTGA  
TGGTTCACAATCAAAGAAAAGATGTGCCTGGGTGACACCTAATACAGATCCA  
TCTTATGCTAATTTCCACGATGAAGAATGGGGAGTTCCAGTCCATGACGACA  
AGAAGCTATTCGAGCTCCTTGTCTTTGCGGGGCATTGGCTGAACTCACCT  
GGCCTTCCAT

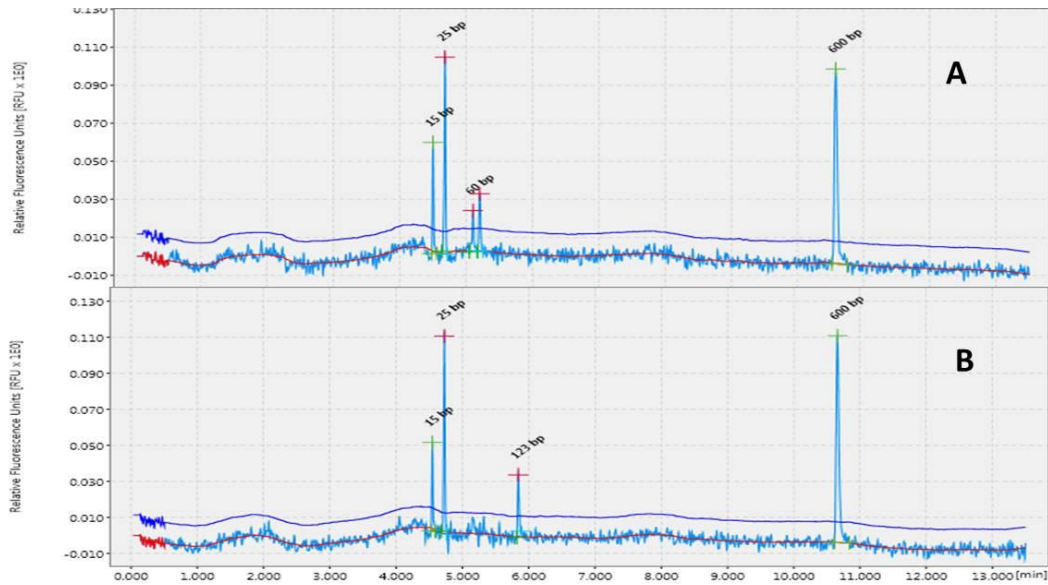
**SNP3:**ACTTCATCAAGTCTGTTTATACGAATAGAACGAAAAGACCATAATATA  
GA[A/G]CGCGCTTCTTCATATATTTCTCTATGGAAGGCCAAGGTGTTGTTTCA  
TTT

**SNP4:**ATGTGATCACCAACCTTTCTTGAAATCCAAATAAGCTTGGTAGACTTG  
AT[T/C]TGAAGTAGGAAGTGAAGTACTGACTGAGTCTCTATTCAAACACCTTT  
CTC

**SNP5:**TGACTTGATATAAAGTTTAANAAAAATNAAAAGGAATAACCCTACAAN  
NAGCATTAAATTTTAGGTACATGGGTCAAGTGTAAGGTATGGATGGGGCAA  
A[A/T]TGAAGANCAAGAAAATGGCAAGAAAGAACTTGTAGAATGNTCAAAGTT  
TTTGAAGAAGAACTTGGAGATAAACTTTATTTTGGAGGAGATGTATTTGGA

## 2.3. AZN ve CW Ebeveynlerinde oluşturulmuş F3 popülasyonunda SNP2 ve N genine yakın diğer markörlerin testlenmesi:

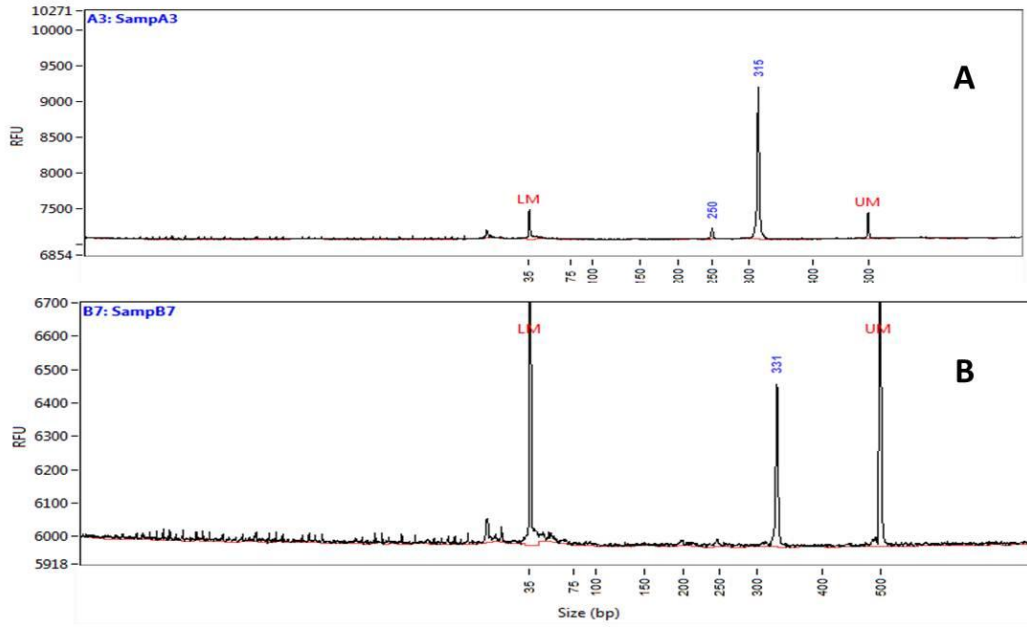
### SNP2 markörüne ait genotip sonuçları:



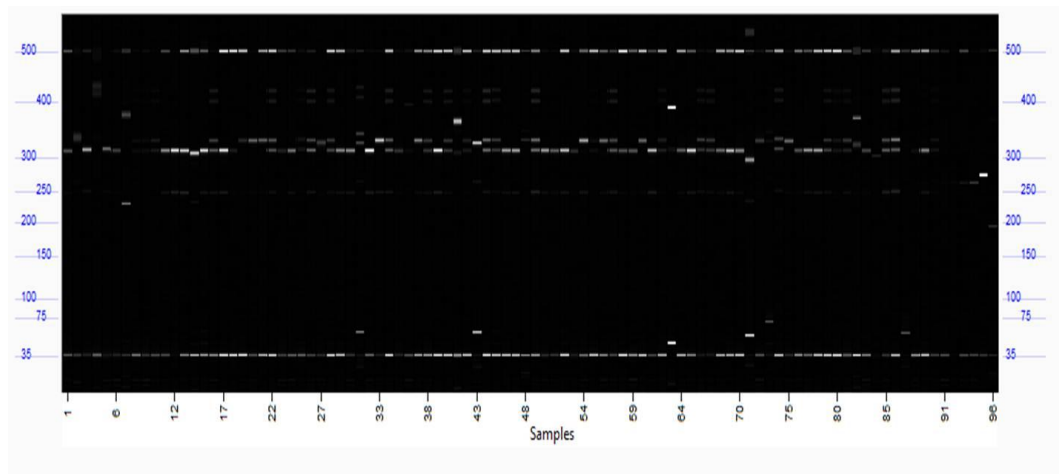
**Şekil 21:** SNP 2 markörünün popülasyon ebeveynlerinde genotip sonuçları  
A: AZN B: CW CAPS profilinin kapiller elektroferogramları.

SNP2 markörünün genotiplenmesi amacı ile SNP konumu için CAPS analizi dizayn edilmiştir. Marköre özel olarak dizayn edilen primer çiftleri ile PZR yapılmış, PZR ürünleri EcoRI enzimi ile inkübe edilmiştir. (A) AZN alleli homozigot olarak kesilir iken, (B) CW alleli ise kesilmemektedir. Geliştirilen SNP'ye dayalı CAPS analizinin F3 popülasyonunda doğruluğu sınanmıştır (Tablo 12).

#### 2.4. SCAR N markörüne ait F3 popülasyonundaki analiz sonuçları:



Şekil 22: SCAR N markörünün popülasyon ebeveynlerinde genotip sonuçları  
A: AZN B: CW CAPS profilinin kapiller elektroferogramları.

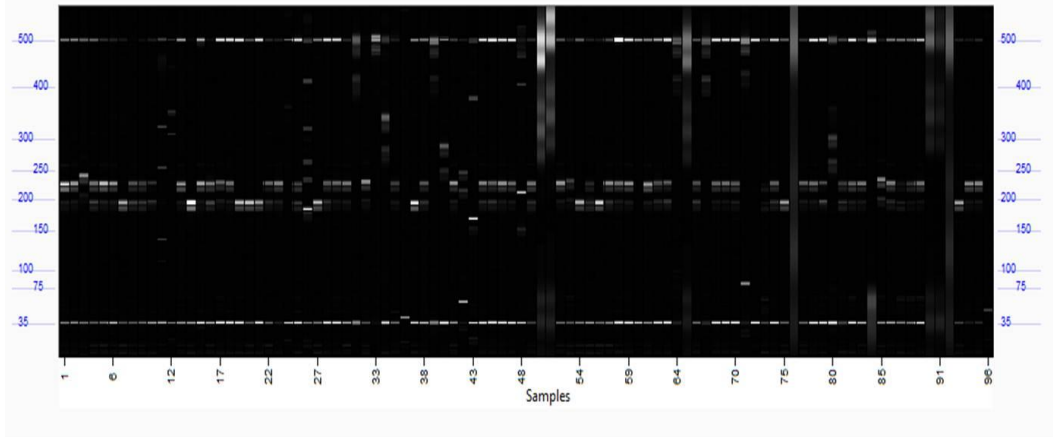


Şekil 23: SCAR N markörünün F3 popülasyonundaki analiz sonuçları

SCAR N markörü dayanıklı bireylerde 315bp civarında PZR ürünü çoğaltırken, duyarlı bireylerde 331 bp civarında PZR ürünü çoğaltmaktadır.

Dominant bir markör olan SCAR N markörü heterozigot bireyleri ayırt edememektedir.

### SCAR PM6a markörüne ait F3 popülasyonundaki analiz sonuçları:



Şekil 24: SCAR PM6a markörüne F3 popülasyonundaki analiz sonuçları.

SCAR PM6a markörü dayanıklı bireylerde 146 bp civarında PZR ürünü çoğaltırken, duyarlı bireylerde 189 bp civarında PZR ürünü çoğaltmaktadır. Dominant bir markör olan SCAR PM6a markörü heterozigot bireyleri ayırt edememektedir.

### 2.5. AZN x CW ebeveynlerinden türetilmiş F3 popülasyonu fenotip ve genotip sonuçları:

Tablo 12. AZN x CW türetilmiş F3 popülasyonuna ait fenotip bilgileri ve SNP 2, SCAR N ve SCAR PM6a markörlerine ait genotipleme sonuçları.

		Plant height	Root length	Galling number	Galling Index	F3 Fenotip	SNP 2	Scar N	SCAR PM6a
<b>1 Carolina Wonder (Dayanıklı)</b>	1	23.2	16.0	0.0	0.0	R	R	R	R
	2	21.5	15.6	0.0	0.0	R	R	R	R
	3	20.2	20.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	4	24.6	20.9	0.0	0.0	R	R	R	R
	5	17.1	8.7	0.0	0.0	R	R	R	R
	6	23.2	14.5	0.0	0.0	R	R	R	S
	7	21.0	14.1	0.0	0.0	R	R	R	R
	8	15.5	12.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	9	17.0	15.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	10	22.2	16.0	0.0	0.0	R	R	R	R
	11	20.5	15.4	0.0	0.0	R	R	R	R
	12	23.1	16.7	0.0	0.0	R	R	R	R
	13	19.6	17.1	0.0	0.0	R	R	R	R

	14	23.2	16.3	0.0	0.0	R	R	R	R
	15	20.6	14.8	0.0	0.0	R	R	R	R
<b>2 California Wonder (Duyarlı)</b>	1	23.2	11.5	852.0	5.0	S	S	S	S
	2	21.1	16.5	932.0	5.0	S	S	S	S
	3	23.5	12.5	745.0	5.0	S	S	S	S
	4	12.0	10.1	359.0	5.0	S	S	S	S
	5	23.5	13.6	655.0	5.0	S	S	S	S
	6	28.2	15.2	872.0	5.0	S	S	S	S
	7	23.7	6.5	358.0	5.0	S	S	S	S
	8	16.5	13.5	276.0	5.0	S	S	S	S
	9	18.1	15.7	728.0	5.0	S	S	S	S
	10	21.2	17.5	41.0	4.0	S	S	S	S
	11	24.8	12.5	688.0	5.0	S	S	S	S
	12	17.0	13.5	336.0	5.0	S	S	S	R
	13	19.6	1402.0	445.0	5.0	S	S	S	S
	14	21.6	14.4	541.0	5.0	S	S	S	S
	15	18.5	15.0	651.0	5.0	S	S	S	S
<b>3 AZN N (Duyarlı)</b>	1	31.5	15.2	455.0	5.0	S	S	S	S
	2	36.5	23.1	552.0	5.0	S	S	S	S
	3	36.2	15.6	825.0	5.0	S	S	S	S
	4	30.6	16.3	658.0	5.0	S	S	S	S
	5	33.1	20.5	553.0	5.0	S	S	S	S
	6	30.0	13.7	412.0	5.0	S	S	S	S
	7	36.8	19.5	653.0	5.0	S	S	S	S
	8	31.8	16.5	354.0	5.0	S	S	S	S
	9	26.3	11.5	535.0	5.0	S	S	S	S
	10	29.5	12.5	672.0	5.0	S	S	S	S
	11	35.1	14.6	832.0	5.0	S	S	S	S
	12	26.5	13.2	938.0	5.0	S	S	S	S
	13	31.5	14.1	720.0	5.0	S	S	S	S
	14	29.3	12.8	635.0	5.0	S	S	S	S
	15	30.3	13.4	711.0	5.0	S	S	S	S
<b>4 No'lu F3</b>	1	37.0	27.6	0.0	0.0	R	R	R	R
	2	29.5	19.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	3	27.5	15.2	0.0	0.0	R	R	R	R
	4	32.5	16.5	475.0	5.0	S	S	S	S
	5	19.2	8.5	35.0	4.0	S	S	R	R
	6	39.4	17.5	3.0	2.0	R	R	R	R
	7	41.5	17.5	0.0	0.0	R	R	S	R
	8	39.5	16.6	0.0	0.0	R	U	R	R
	9	34.5	16.6	0.0	0.0	R	R	S	R

	10	23.5	23.3	0.0	0.0	R	R	R	R
	11	34.8	19.5	655.0	5.0	S	S	R	R
	12	28.5	21.0	0.0	0.0	R	R	R	R
	13	32.5	31.2	0.0	0.0	R	R	R	R
	14	43.5	22.0	0.0	0.0	R	R	R	R
	15	30.0	19.0	0.0	0.0	R	R	R	S
<b>5 No'lu F3</b>	1	26.1	18.2	0.0	0.0	R	R	R	R
	2	27.2	12.7	0.0	0.0	R	R	R	R
	3	26.2	12.6	0.0	0.0	R	R	R	R
	4	25.3	14.4	0.0	0.0	R	R	R	S
	5	30.5	19.5	360.0	5.0	S	R	R	S
	6	29.1	14.5	87.0	4.0	S	S	S	S
	7	28.5	17.1	0.0	0.0	R	R	R	R
	8	26.0	17.0	0.0	0.0	R	R	R	R
	9	27.2	20.7	0.0	0.0	R	R	R	R
	10	26.5	27.7	650.0	5.0	S	S	S	S
	11	25.6	13.2	0.0	0.0	R	S	S	S
	12	33.2	13.7	0.0	0.0	R	R	S	R
	13	28.6	11.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	14	37.5	13.6	0.0	0.0	R	R	R	R
	15	24.4	18.5	0.0	0.0	R	R	R	R
<b>6 No'lu F3</b>	1	26.1	13.8	0.0	0.0	R	R	R	R
	2	26.0	14.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	3	25.4	13.4	0.0	0.0	R	R	R	R
	4	24.6	15.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	5	24.1	16.7	0.0	0.0	R	R	R	R
	6	31.0	12.5	0.0	0.0	R	R	R	S
	7	27.5	13.1	0.0	0.0	R	R	R	R
	8	29.5	15.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	9	26.0	15.0	0.0	0.0	R	R	R	R
	10	24.5	17.2	0.0	0.0	R	R	R	R
	11	29.3	18.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	12	29.0	15.2	0.0	0.0	R	R	R	R
	13	29.6	15.3	0.0	0.0	R	R	R	S
	14	31.5	17.6	0.0	0.0	R	R	R	R
	15	29.3	11.6	0.0	0.0	R	U	R	R
<b>7 No'lu F3</b>	1	32.6	13.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	2	30.1	13.7	85.0	4.0	S	S	S	S
	3	30.0	14.5	3.0	2.0	R	R	R	S
	4	24.5	12.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	5	33.5	13.8	0.0	0.0	R	R	R	R
	6	28.5	15.6	170.0	5.0	S	S	R	S
	7	29.5	15.5	55.0	4.0	S	S	S	S



	8	32.1	13.0	0.0	0.0	R	R	S	S
	9	37.0	12.5	0.0	0.0	R	R	S	R
	10	37.5	14.7	0.0	0.0	R	R	R	S
	11	32.3	14.2	0.0	0.0	R	R	R	R
	12	29.3	14.7	0.0	0.0	R	R	R	R
	13	28.0	16.1	0.0	0.0	R	U	U	R
	14	30.5	19.0	0.0	0.0	R	R	R	R
	15	28.5	13.0	105.0	5.0	S	S	S	S
	16	30.0	15.0	0.0	0.0	R	R	R	R
	17	34.1	13.5	0.0	0.0	R	R	R	R
<b>8 No'lu F3</b>	1	33.2	21.1	66.0	5.0	S	S	S	S
	2	32.5	17.7	0.0	0.0	R	R	R	R
	3	33.5	14.1	0.0	0.0	R	R	R	S
	4	31.6	18.1	0.0	0.0	R	R	U	R
	5	28.5	19.4	0.0	0.0	R	R	R	R
	6	38.5	15.1	680.0	5.0	S	S	S	S
	7	31.0	15.6	111.0	5.0	S	S	S	S
	8	32.0	17.5	1.0	1.0	R	R	R	R
	9	41.5	16.1	5.0	1.0	R	R	R	R
	10	32.5	17.8	0.0	0.0	R	R	R	R
	11	33.5	20.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	12	32.7	15.0	65.0	4.0	S	S	R	S
	13	34.3	14.7	0.0	0.0	R	U	R	R
	14	34.5	14.1	0.0	0.0	R	R	R	R
	15	35.5	17.0	0.0	0.0	R	R	R	R
<b>9 No'lu F3</b>	1	27.5	15.6	0.0	0.0	R	R	R	S
	2	27.5	20.0	2.0	1.0	R	R	R	R
	3	26.8	15.6	2.0	1.0	R	R	R	R
	4	25.4	20.5	0.0	0.0	R	R	S	R
	5	31.7	15.7	3.0	2.0	R	R	U	R
	6	29.6	16.7	0.0	0.0	R	R	R	R
	7	23.5	15.0	0.0	0.0	R	R	R	R
	8	26.6	12.6	0.0	0.0	R	R	R	R
	9	23.5	13.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	10	29.5	17.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	11	29.1	17.1	0.0	0.0	R	R	R	R
	12	29.5	15.4	0.0	0.0	R	R	R	R
	13	30.5	16.8	0.0	0.0	R	R	U	R
	14	28.1	21.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	15	27.0	17.6	3.0	2.0	R	R	R	R
<b>10 No'lu F3</b>	1	32.5	16.5	0.0	0.0	R	R	S	R
	2	29.5	17.1	0.0	0.0	R	R	S	R
	3	36.2	17.1	0.0	0.0	R	U	R	R

	4	26.5	14.4	0.0	0.0	R	R	R	R
	5	32.0	13.5	8.0	2.0	R	R	S	R
	6	34.4	14.6	0.0	0.0	R	R	R	R
	7	33.6	14.5	196.0	5.0	S	S	S	R
	8	31.4	17.0	5.0	1.0	R	R	R	R
	9	35.4	15.6	0.0	0.0	R	R	R	R
	10	29.8	17.3	130.0	5.0	S	R	S	R
	11	21.2	13.1	0.0	0.0	R	R	R	R
	12	30.8	15.1	0.0	0.0	R	R	R	R
	13	28.6	13.4	0.0	0.0	R	R	R	R
	14	38.0	16.2	13.0	3.0	S	R	R	R
	15	35.4	13.2	0.0	0.0	R	R	R	R
	16	30.6	18.5	220.0	5.0	S	S	S	S
<b>11 No'lu F3</b>	1	33.2	24.3	0.0	0.0	R	R	R	R
	2	22.5	19.1	0.0	0.0	R	R	R	R
	3	34.9	16.6	0.0	0.0	R	R	R	R
	4	29.6	15.0	300.0	5.0	S	S	R	S
	5	35.0	25.9	0.0	0.0	R	R	R	R
	6	25.6	22.0	995.0	5.0	S	S	S	S
	7	28.5	20.6	0.0	0.0	R	R	R	R
	8	32.5	17.5	1.0	1.0	R	R	R	R
	9	24.1	19.7	0.0	0.0	R	R	R	R
	10	33.7	13.6	15.0	3.0	S	R	R	S
	11	36.2	17.8	0.0	0.0	R	R	R	R
	12	38.0	14.5	500.0	5.0	S	S	S	S
	13	29.1	21.2	3.0	2.0	R	R	R	R
	14	31.7	17.3	1.0	1.0	R	R	R	R
	15	31.8	30.2	0.0	0.0	R	R	R	R
	16	26.0	18.1	2.0	1.0	R	R	R	R
	17	31.5	26.0	1.0	1.0	R	R	R	R
<b>12 No'lu F3</b>	1	25.0	14.6	0.0	0.0	R	R	R	R
	2	29.6	14.0	0.0	0.0	R	R	R	R
	3	27.6	13.0	0.0	0.0	R	R	R	R
	4	34.7	13.6	0.0	0.0	R	R	R	S
	5	31.5	17.0	0.0	0.0	R	R	R	R
	6	36.1	19.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	7	29.5	14.2	0.0	0.0	R	R	R	R
<b>13 No'lu F3</b>	1	27.8	16.7	8.0	2.0	R	R	R	R
	2	24.2	15.6	3.0	2.0	R	R	R	R
	3	25.2	16.1	0.0	0.0	R	R	R	R
	4	25.6	16.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	5	27.5	20.7	1.0	1.0	R	R	R	R
	6	26.8	15.2	760.0	5.0	S	S	S	R

	7	25.4	15.2	0.0	0.0	R	R	R	R
	8	26.7	20.7	0.0	0.0	R	R	R	R
	9	20.5	22.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	10	22.3	13.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	11	28.5	28.0	0.0	0.0	R	R	R	R
	12	23.6	16.4	0.0	0.0	R	R	R	R
	13	21.4	15.4	0.0	0.0	R	R	R	R
	14	21.2	14.3	135.0	5.0	S	S	S	S
	15	20.4	25.5	97.0	4.0	S	S	R	S
	16	23.2	15.4	60.0	4.0	S	S	S	S
	17	23.7	16.0	0.0	0.0	R	R	R	R
<b>14 No'lu F3</b>	1	30.7	21.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	2	30.1	11.6	0.0	0.0	R	R	R	R
	3	33.2	17.3	0.0	0.0	R	R	R	R
	4	35.6	18.7	0.0	0.0	R	R	R	R
	5	33.2	15.2	0.0	0.0	R	R	R	R
	6	28.1	14.6	0.0	0.0	R	R	R	R
	7	34.1	14.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	8	33.0	15.6	0.0	0.0	R	R	R	R
	9	32.8	22.8	0.0	0.0	R	R	R	R
	10	31.8	20.1	0.0	0.0	R	R	R	S
	11	31.2	15.6	0.0	0.0	R	R	R	R
	12	29.4	17.2	0.0	0.0	R	R	R	R
	13	35.0	18.0	0.0	0.0	R	R	R	R
	14	27.8	13.2	0.0	0.0	R	R	R	R
	15	33.2	19.7	0.0	0.0	R	R	R	R
	16	38.6	21.8	0.0	0.0	R	R	R	R
	17	28.6	20.7	0.0	0.0	R	R	R	R
<b>15 No'lu F3</b>	1	41.8	18.5	285.0	5.0	S	S	S	S
	2	33.6	18.1	97.0	4.0	S	S	S	S
	3	36.2	13.6	210.0	5.0	S	S	S	S
	4	40.3	16.5	350.0	5.0	S	S	S	S
	5	37.6	15.6	455.0	5.0	S	S	S	S
	6	36.4	19.2	380.0	5.0	S	S	S	S
	7	36.7	16.6	102.0	5.0	S	S	S	S
	8	45.8	15.7	125.0	5.0	S	S	S	S
	9	42.5	15.6	380.0	5.0	S	S	S	S
	10	39.6	14.8	80.0	4.0	S	S	S	S
	11	42.7	15.8	180.0	5.0	S	S	R	S
	12	32.1	19.2	285.0	5.0	S	S	S	S
	13	42.5	28.7	215.0	5.0	S	S	S	S
	14	43.7	18.0	120.0	5.0	S	S	S	S
	15	42.8	18.5	65.0	4.0	S	S	R	S

	16	40.6	16.5	0.0	0.0	R	S	R	R
	17	29.7	14.6	85.0	4.0	S	S	S	S
<b>16 No'lu F3</b>	1	27.5	24.6	0.0	0.0	R	R	R	R
	2	28.6	16.2	0.0	0.0	R	R	R	R
	3	30.6	18.5	2.0	1.0	R	R	R	R
	4	19.6	15.1	0.0	0.0	R	R	R	R
	5	31.0	15.6	0.0	0.0	R	R	R	R
	6	28.3	11.7	0.0	0.0	R	R	R	R
	7	21.8	19.8	0.0	0.0	R	R	R	R
	8	34.0	14.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	9	27.4	15.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	10	20.2	29.6	0.0	0.0	R	R	R	R
	11	30.8	16.2	176.0	5.0	S	S	S	R
	12	22.7	21.6	46.0	4.0	S	S	S	S
	13	21.0	21.8	0.0	0.0	R	R	R	R
	14	20.3	17.5	0.0	0.0	R	R	R	R
<b>17 No'lu F3</b>	1	30.7	14.5	45.0	4.0	S	R	S	S
	2	22.4	13.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	3	35.7	15.2	1.0	1.0	R	R	R	R
	4	23.5	13.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	5	29.5	14.4	56.0	4.0	S	S	S	S
	6	27.5	15.4	5.0	2.0	R	R	R	R
	7	38.0	14.7	0.0	0.0	R	R	R	R
	8	34.0	18.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	9	25.7	15.6	0.0	0.0	R	R	R	R
	10	30.8	14.1	0.0	0.0	R	R	R	R
	11	27.5	12.6	0.0	0.0	R	R	R	R
	12	32.5	23.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	13	26.5	16.1	0.0	0.0	R	R	R	R
	14	23.5	13.6	0.0	0.0	R	R	R	S
	15	33.3	18.6	0.0	0.0	R	R	R	R
	16	28.0	14.6	180.0	5.0	S	S	S	S
	17	32.6	12.5	0.0	0.0	R	R	S	R
	18	34.0	12.0	95.0	4.0	S	S	S	S
	19	38.0	15.3	0.0	0.0	R	R	R	R
	20	35.8	14.5	0.0	0.0	R	R	R	R
	21	29.5	16.8	0.0	0.0	R	R	R	R

## SONUÇLAR

Biberin büyümesini ve gelişmesini engelleyen en önemli biyotik faktörlerden biri kök uru nematodlarıdır (Meloidogyne spp.). Kök uru nematodlarına dirençli yeni çeşitlerin geliştirilmesi hem ekonomik anlamda, hem de agronomik olarak elzemdir. Biber bitkisinin germplazmında kök uru nematodlarına dirençliliği sağlayacak genetik çeşitlilik mevcuttur. Bu genetik çeşitlilikten faydalanarak ıslah programları hazırlanması gereklidir. Özellikle son 15 yıllık süreçte gelişen moleküler teknolojiler kullanılarak MAS (markör destekli seleksiyon) uygulamaları yapılmakta ve çok başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Proje kapsamında MAS uygulamalarında kullanılmak üzere N genine sıkı sıkıya bağlı moleküler markörlerin geliştirilmesi öngörülmüş, projenin tamamlanması ile mevcut literatürde var olan markörlere kıyasla N genine çok daha yakın yeni bir SNP markörü geliştirilmiş ve bu markör projede kullanılan haritalama popülasyonundan türetilen bir sonraki jenerasyonda (F3) denenmiştir. Aynı zamanda bahsi geçen F3 popülasyonunda literatürde var olan ve N geninin seçiminde kullanılabileceği önerilen markörler de (SCAR N ve SCAR PM6a) uygulanmıştır. Proje kapsamında geliştirilen SNP markörünün, literatürde var olan diğer tüm markörlerden daha doğru sonuçlar verdiği görülmüştür. Proje kapsamında bibere özel geliştirilmiş 407 adet SSR markörü haritalama popülasyonu ebeveynlerinde (CW ve AZN) polimorfizm yönünden taranmış, yalnızca 41 tanesi polimorfik bulunmuştur. Ayrıca tüm bitki türlerinde kullanılmak üzere geliştirilmiş 238 adet SRAP primer kombinasyonu, her iki ebeveyne ait DNA örnekleri kullanılarak test edilmiş, toplam 47 adet polimorfik SRAP bandı tespit edilmiştir. Bahsi geçen markörlerin haritalama popülasyonunda açılımlarına bakılmış ancak bu markörlerden hiçbirinin literatürde var olan markörlere kıyasla daha yakın bir ilişki vermediği gözlemlenmiştir. Güney Kore'nin Seoul üniversitesinden Doil Choi ve arkadaşları, 2013 yılında biber genomunu dizileme analizlerini tamamlamışlardır. Proje kapsamında biyoinformatik araçlar kullanılarak N genine ait genom bölgesinin dizileri incelenmiş ve bu bölgeye özel genom dizileri domates SNP haritasında taranarak aday yeni SNP markörleri geliştirilmiştir (Şekil 20). Geliştirilen SNP markörleri ve literatürde var olan N geni ile bağlantılı markörler genetik harita üzerinde aynı küme içerisinde (Şekil 20) beklendiği gibi gruplanmaktadır. Geliştirilen SNP markörlerinden N genine en yakın olduğu tespit edilen "SNP2" markörü, SCAR N ve SCAR PM6a, proje kapsamında testlenmesi öngörülen F3 popülasyonunda analiz edilmiş ve fenotipik data ile tutarlılıkları karşılaştırılmıştır. Proje kapsamında geliştirilen



SNP2 markörünün, diğer markörlerden çok daha tutarlı sonuçlar verdiği doğrulanmıştır. 263 bireyden oluşan F3 popülasyonunda yapılan fenotipik ve genotipik çalışmaların sonucunda literatürde bulunan ve N genine 2 cM uzaklığında olduğu test edilmiş SCAR N ve SCAR PM6a markörleri ile proje kapsamında geliştirilen SNP2 markörünün güvenilirlikleri ve doğrulukları test edilmiştir. SCAR N markörü 263 bireyin 18 adedinde, SCAR PM6a ise 263 bireyin 22 adedinde fenotipik veriler ile uyumlu sonuç vermemiştir. SNP2 markörü, 263 bireyin yalnızca 8 adedinde fenotipi hatalı tahmin etmiştir. Yayına hazırlanmakta olan çalışmamız kapsamında N geninin tanımlanmasında kullanılmak üzere literatürde mevcut olan tüm markörlerden daha güvenilir, kodominant ve N geni ile sıkı sıkıya bağlantılı yeni bir markör geliştirilmiştir. Bu markör sayesinde hem daha güvenilir MAS uygulamaları yapılabilecek, hem de önümüzdeki süreçte hedefimiz olan N geninin izole edilmesinde kullanılmak üzere önemli bir araç olacaktır

## **EKLER**

## KAYNAKLAR

- Abad, P., Favery, B., Rosso, MN., Castagnone-Sereno, P. (2003). "Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction", *Molecular Plant Pathology*, 4, 217-224.
- Ağdacı, 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*, 47.
- Atkinson, HJ., Urwin, PE., Hansen, E., McPherson, MJ. (1995). "Designs for engineered resistance to root-parasitic nematodes", *Trends in Biotechnology*, 13, 369–374.
- Barker, KR. (1985). "Nematode Extraction and Bioassays", sayfa 30. *An Advanced Treatise on Meloidogyne: 2 Methodology*. Editör: Barker, K.R., Carter, C.C., Sasser, J.N. Nort Carolina State University Grafics.
- BATEM (2008). <http://www.batem.gov.tr/urunler/sebzelerimiz/biber/biber.htm>,  
Son erişim tarihi:10 Nisan 2014.
- Berthou, F., Palloix, A., Mugniery, D. (2003). "Characterisation of virulence in populations of *Meloidogyne chitwoodi* and evidence for a resistance gene in pepper *Capsicum annuum* L. line PM217", *Nematology*, 5, 383-390.
- Bird, DM., Kaloshian, I. (2003). "Are roots special? Nematodes have their say", *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62, 115–123.
- Broun, AL., Supkoff, DM. (1994). "Options to Methly Bromide for the Control of Soilborne Diseases and Pests in California with Reference to the Netherlands", *Pest Management Analysis and Planning Program*, State of California, Environmental Monitoring and Pest Management Branch. California,52.
- Cabrera Poch, HL., Lopez, RHM., Kanyuka, K. (2006). " Functionality of resistance gene *Hero*, which controls plant root-infecting potato cyst nematodes, in leaves of tomato", *Plant, Cell & Environment*, 29, 1372-1378.
- Chitwood, DJ. (2003). " Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture", *Agricultural Research Service. Pest Management Science*, 59, 748–753.

- Dale, MFB., Phillips, MS. (1982). "An investigation of resistance to the white potato cyst-nematode", *Journal of Agricultural Science*, 99, 325–328.
- Decker, H., Fritzsche, R. (1991). "Resistenz von kulturpflanzen gegen Nematoden", Akademie-Verlag-Berlin, 340.
- Devran, Z. and Söğüt, MA. (2010). "Occurrence of virulent root knot nematode populations on tomatoes bearing the Mi gene in protected vegetable growing areas of Turkey", *Phytoparasitica*, 38, 245-251.
- Djian-Caporalino, C., Pijarowski, L., Januel, A., Lefebvre, V., Daubeze, A., Palloix, A., Dalmaso, A., Abad, P. (1999). "Spectrum of resistance to root knot nematodes and inheritance of heat stable resistance in pepper (*Capsicum annuum* L.)", *Theor Appl Genet*, 99, 496-502.
- Djian-Caporalino, C., Pijarowski, L., Fazari, A., Samson, M., Gaveau, L., O'Byrne, C., Lefebvre, V., Caranta, C., Palloix, A., Abad, P. (2001). "High-resolution genetic mapping of the pepper (*Capsicum annuum* L.) resistance loci *Me3* and *Me4* conferring heat-stable resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.)", *Theor Appl Genet*, 103, 592-600.
- Djian-Caporalino, C., Fazari, A., Arguel, MJ., Vernie, T., VandeCastele, C., Faure, I., Brunoud, G., Pijarowski, L., Palloix, A., Lefebvre, V., Abad, P. (2006). "Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) *Me* resistance genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) are clustered on the P9 Chromosome", *Theor Appl Genet*, 114, 473-486.
- Elekçioğlu, İH., Ohnesorge, B., Lung, G., Uygun, N. (1994). "Plant Parasitic Nematodes in the Mediterranean Region of Turkey" *Nematol Medit*, 22, 59-63.
- Elekçioğlu, İH., 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.
- FAO (2008) <http://www.fao.org>. Son erişim tarihi: 01.04.2014
- Fery, RL. and Dukes, PD. (1997). "The inheritance of resistance to the southern root-knot nematode in 'Carolina Hot' Cayenne pepper", *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 121, 1024-1027.
- Fery, RL. and Thies, JA. (1997). "Evaluation of *Capsicum chinense* Jacq. Cultigens for resistance to the southern root knot nematode", *HortScience*, 32, 923-926.
- Fulton, TM., Chunwongse, J., Tanksley, SD. (1995). "Microprep protocol



for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants”, Plant Mol Biol Repr, 13, 207-209.

- Gözel, U., Güneş, Ç. (2007). “Çanakkale İli Yazlık Sebze Alanlarındaki Meloidogyne Goeldi, 1892 (Nemata: Heteroderidae) Türlerinin Belirlenmesi”, Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 27-29 Ağustos 2007, Isparta, 252.
- Hadisoeganda, WW., Sasser, JN. (1982). “Resistance of tomato, bean, southern pea, and garden pea cultivars to Root-knot nematodes based on host suitability”. Plant Disease, 66, 145–150.
- Hare, WW. (1956). “Resistance in pepper to *Meloidogyne incognita acrita*” Phytopathology, 46, 98-104.
- Hare, WW. (1957). “Inheritance of resistance to root knot nematodes in pepper”, Phytopathology, 47,455-459.
- Hendy, H., Pochard, E. and Dalmaso, A. (1983). “Identification de deux nouvelles souches de résistance aux nématodes du genre *Meloidogyne* chez le piment, *Capsicum annuum* L. C.R”, Séances Acad. Agric. Fr., 69,817-822.
- Hendy, H., Dalmaso, A. (1985). “Inheritance of Resistance to Meloidogyn chitwood (Tylenchida) in 2 lines of *Capsicum annuum* L. Study of homozygousprogenies obtained by androgenesis”, Agronomie,5, 93-100.
- Hooper, DJ. (1986). “Extraction of nematodes from plant material”sayfa 51-59. Southey Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes. Editör: J.F. Her Majesty’s Stationary Office, London
- Johnson, AV., Fassuliotis, G. (1984). “Nematode Parasites of Vegetable Crops”, sayfa 323-372. Plant and Insect Nematodes. Editör: W.R., Nickle Marcel Deccer Inc., New York and Basel.
- Kaşkavalcı, G., Öncüer, C. (1998). “Kök-ur Nematodlarının (*Meloidogyne* spp.) Yazlık Sebzelerdeki Zararı ve Aydın İlindeki Durumu”, Ege Bölgesi 1. Tarım Kongresi, 7-11 Eylül 1998, Aydın-Türkiye, 436-443.
- Khan, AA., Khan, MW. (1991). “Suitability of Some Cultivars of Peppers as Hosts for *Meloidogyne javanica* and Races of *M. Incognita*” Nematologia Mediterranea, 19, 51-53.
- Kim, HJ., Lee, HR., Han, JH., Yeom, SI., Harn, CH. and Kim, BD. (2008). “Marker production by PCR amplification with primer pairs from conserved sequences of WRKY genes in the chili pepper”, Mol Cells, 25, 196-204.

- Koenning, SR., Overstreet, C., Noling, JW., Donald, PA., Becker, JO., Fortnum, BA. (1999). "Survey of crop losses in response to phytoparasitic nematodes in the United States for 1994" *Journal of Nematology*, 31, 587–618.
- Li, G. and Quiros, CF. (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.
- Mennan, S., Ecevit, O. (1996). "Bafra ve Çarşamba Ovaları yazlık sebze ekim alanlarındaki Kök ur nematodları (*Meloidogyne* spp.)'nın biyolojisi, yayılışı ve bulaşık oranları üzerine araştırmalar", *Türkiye III. Entomoloji Kongresi Bildirileri*, 700–705.
- Mennan, S., Ecevit, O. (2001). "Bafra ve Çarşamba Ovaları'ndan elde edilen bazı *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) (Nemata: Heteroderidae) populasyonlarında ırk tespiti", *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 25 (1), 33–39.
- Michelmores, RW., Paran, I. and Kesseli, RV. (1991). "Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic region using segregating population", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88,9828–9832.
- Nagy, I., Stigel, A., Sasvari, Z., Röder, M., Ganai, M. (2007). "Development , characterization and transferability to other Solanaceae of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annuum* L.)", *Genome*, 50, 668-688.
- Netscher, C., Sikora, RA. (1990). "Nematode parasites on vegetables" sayfa 231-283. *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. Editörler: Luc, M., Sikora, R.A., Bridge, J. CAB International.
- Noe, JP. (1992). "Variability among populations of *Meloidogyne arenaria*", *J Nematol*, 24, 404-414.
- Özarslandan, A., Elekçioğlu, İH. (2003). "Bazı hıyar, domates ve biber çeşitlerinin Kök-ur Nematodları (*Meloidogyne javanica* Chitwood, 1949 ırk-1 ve *M. incognita* Chitwood, 1949 ırk-2) (Nemata: Heteroderidae)'na karşı dayanıklılıklarının araştırılması", *Türk Entomol Derg*, 27 (4), 279-291.
- Özarslandan, A. Mutlu, N., Devran, Z., Elekçioğlu, İH. (2007). "Türkiye'de Patates Yetiştiriciliğinde Çok Önemli Yeni Bir Tür: *Meloidogyne chitwoodi*



TÜBİTAK

(Goeldi, 1892, Nemata, Heteroderidae).“,Türkiye II. Bitki Koruma Kngresi Bildirileri, 27-29 Ağustos 2007, Isparta, 77.

- Pehlivan, E., Kaşkavalcı, B. (1993). “Sanayi domates üretim alanlarında Kök-ur nematodlarının (*Meloidogyne* spp) yayılışı ve bulaşıklık oranı üzerinde araştırmalar”, SANDOM Çalışma Raporu,6, 61–68.
- Roberts, PA. (1995). “Conceptual and practical aspects of variability in rootknot nematodes related host-plant resistance”, Annual Review of Phytopathology, 33,199–221.
- Sasser, JN. (1980). “Root-knot nematodes: a global menace to crop production”,Plant Disease, 64, 36–41.
- Sasser, JN., Carter, CC. (1985). “Overview of the International Meloidogyne project, 1974-1984”, sayfa 19-24 . An Advanced Treatise on Meloidogyne: Volume 1, Biology and Control. North Carolina State University Grafics.
- Sasser, JN. (1990). “Plant Parasitic Nematodes: The Farmer’s Hidden Enemy”, John Wiley&Sons, Inc., North Caroline, 115.
- Sasser, JN., Freckman, DW.(1987). “A world perspective on nematology: the role of the society”,sayfa 7-14. Vistas on nematology. Editörler: Veech, JA., Dickerson, DW. Hyatsville, MD USA: USA Society of Nematologists.
- Siddiqi, MR. (2000). “Tylenchida Parasites of Plants and Insects” CABI Publishing. CAB International, Wallingford, UK. 2 nd. Edition, 805.
- Sobczak, M., Avrova, A., Jupowicz, J., Phillips, MS., Ernst, K., Kumar, A. (2005). “Characterization of susceptibility and resistance responses to potato cyst nematode (*Globodera* spp.) infection of tomato lines in the absence and presence of the broad-spectrum nematode resistance *Hero* gene”, Molecular Plant–Microbe Interactions, 18, 158–168.
- Sorribas, FJ., Ornat, C., Verdejo-Lucas, S., Galeano, M., Valero, J. (2005). “Effectiveness and profitability of the Mi-resistant tomatoes to control root-knot nematodes” European Journal of Plant Pathology, 111,29–38.
- Söğüt, MA., Elekçioğlu, İH. (2000). “Akdeniz Bölgesi’nde sebze alanlarında bulunan *Meloidogyne Goeldi*, 1892 (Nemata: Heteroderidae) türlerinin ırklarının belirlenmesi”, Türkiye Entomoloji Dergisi, 24 (1), 33-40.
- Söğüt, MA., Elekçioğlu, İH. (2007). “Methyl Bromide Alternatives for Controlling *Meloidogyne incognita* in Pepper Cultivars in the Eastern



Mediterranean Region of Turkey”, Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 31(1), 31-41.

- Stam, P. (1993). “Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: Joinmap”, Plant Journal, 3, 739-744.
- Taylor, AL. and Sasser, JN. (1978). “Identification and control of root knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in crops”, Publ. Dept. Plant Pathol, North Carolina State Univ. and U.S. Agency Int. Dev. Raleigh, N.C, 111.
- Thies, JA., Mueller, JD. and Fery, RL. (1997). “Effectiveness of resistance to southern root-knot nematode in ‘Carolina Cayenne’ pepper in greenhouse, microplot, and field tests”, J. Amer. Soc. Hort. Sci., 122, 200-204.
- Thies, JA. (2004). “Identification of AFLP Markers Linked to the *N* gene for root-knot Nematode Resistance in pepper” IFAFS Final Report, 1-14.
- Thies, JA., Fery, RL. (2000). “Characterization of resistance conferred by the *N* gene to *Meloidogyne arenaria* races 1 and 2, M. hapla, and M. Javanica”, J Amer Soc Hort Sci, 125, 71-75.
- Thies, JA. and Ariss, JJ. (2009). “Comparison between the *N* and *Me3* genes conferring resistance to the root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in genetically different pepper lines (*Capsicum annuum*)”, Eur J Plant Pathol, 125, 545-550.
- Van Ooijen, J. (2001). “JoinMap® 3.0: Software for the calculation of genetic linkage maps”, Plant Research International, Wageningen, the Netherlands.
- Vito, MD., Greco, N., Carella, A. (1985). “Population Densities of *Meloidogyne incognita* and Yield of *Capsicum annum*”, Journal of Nematology, 17(1), 45-49.
- Wang, LH., Gu, XH., Hua, MY., Mao, SL., Zhang, ZH., Peng, DL., Yun, XF., Zhang, BX. (2009). “A SCAR marker linked to the *N* gene for resistance to root knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in pepper (*Capsicum annum* L.)”, Scientia Horticulturae, 122, 318-322.
- Williamson, VM., Kumar, A. (2006). “Nematode resistance in plants: the battle underground”, Trends in Genetics, 22, 396–403.
- Wu, F., Eannetta, NT., Xu, Y., Durrett, R., Mazourek, M., Jahn, MM. and Tanksley, SD. (2009). “A COSII genetic map of the pepper genome provides a detailed picture of synteny with tomato and new insights into recent chromosome evolution in the genus *Capsicum*” Theor Appl Genet, 118, 1279–1293.



- Yücel, S., Elekçioğlu, İH., Can, C., Söğüt, MA., Özarılandan, A. (2007). "Alternative Treatments to Methyl Bromide in the Eastern Mediterranean Region of Turkey", Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 31(1), 47-55.
- 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.
- Zamora, E., Bosland, PW. and Thomas, S. (1994). "Carolina Cayenne' as a source of resistance to *Meloidogyne incognita* races 1, 2, 3 and 4" HortScience, 29, 1184-1185.