T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

# DOMATES MUTANTLARINDA YAPILACAK DETAYLI GENOM SEKANS ANALİZLERİYLE DAYANIKLILIK GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

**Proje No**: **FBA-2024-6650**

Normal Araştırma Projesi

## SONUÇ RAPORU

**Proje Yürütücüsü:**
Doç. Dr. Özer ÇALIŞ
Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü

Abdellahi GALLEDOU
Abdul Razak AHMED
Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü

Kasım 2025

ANTALYA

Bu Proje Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu proje Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesinde başlayan ve Akdeniz Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi tarafından desteklenerek nihayet erdirilen uzun soluklu bir çalışmadır. Çalışmaya maddi desteklerini esirgemeyen Akdeniz Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimine öncelikle katkılarından dolayı teşekkür ediyorum.

Bu uzun soluklu çalışmada klasik ethylmethanosülfonate ile kimyasal mutasyona uğratılan domates tohumları Prof. Dr. Randy GARDNER (North Carolina Üniversitesi, Amerika Birleşik Devletleri) dan temin edilmiştir. Bu nedenle Prof. Dr. GARDNER a teşekkürlerimi sunmayı borç biliyorum. Çalışmanın her aşamasında bana yardım eden, destekleyen öğrencilerim Doç. Dr. Şerife TOPKAYA, Dr. Demet ÇELİK ERTEKİN, Dr. Öğr. Üyesi Yusuf BAYAN, Dr. Sevilay SAYGI, Dr. Deniz KARABULUT, Yük. Zir. Müh. Halil KARAKAŞ, Yük. Zir. Müh. Ferhat ÖZDEMİR'e ayrı ayrı teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca projede yaptığı danışmanlık ve değerli katkıları nedeniyle Prof. Dr. Halit ÇAM ve Prof. Dr. Yusuf YANAR hocalarıma teşekkür ediyorum. Tüm bu arkadaşlarım bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığına karşı kimyasal mutasyondan dayanıklılık genin haritalanmasına, karakterizasyonuna kadar çok yoğun çalışmalarda bulunmuşlardır. Bu projenin Akdeniz Üniversitesi ayağında görev alan Yük. Zir. Müh. Abdellahi GALLEDOU, Doktora Öğrencisi Abdul Rezaq AHMED ve Doktora Öğrencisi Mümin İbrahim TEK'e ayrıca minnettarlıklarımı sunuyorum. Projeyi gerçekleştirirken değerli fikirleri, görüşleri ve katkılarıyla hep yanımda olan Doç. Dr. Hakan FİDAN ve Prof. Dr. Engin YOL'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu çalışma içerisinde kurguladığım en uzun soluklu proje olup 2009 yılında başlayan, 16 yıl sonra dahi çok sayıda dayanıklılık genini içeren bir projedir. Sonuçlarının bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığının kontrolünde kesinlikle fark oluşturacağını inanıyorum. Elde edilen bu sonuçların Uluslararası Dergilerde yayımlanması konusunda zerre kadar kuşkum bulunmamaktadır.

Çalışmanın başlangıcından bugüne kadar hep yanımda olan Aileme sonusz teşekkürler ediyorum.

Saygılarımla.

Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

Proje Yürütücüsü

**İÇİNDEKİLER**


| | Sayfa No |
|---|---|
| ÖZET | 5 |
| ABSTRACT | 6 |
| 1. GİRİŞ | 7 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 8 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 9 |
| 4. BULGULAR | 11 |
| 5 TARTIŞMA VE SONUÇ | 16 |
| 6 KAYNAKLAR | 18 |
| 7. EKLER | 20 |

**Domates Mutantlarında Yapılacak Detaylı Genom Sekans Analizleriyle Dayanıklılık Genlerinin Araştırılması**


## ÖZET

Kışlık domates üretiminin %60 dan fazlasını tek başına karşılayan Antalya'da bu sebzenin üretimini kısıtlayan önemli bakteriyel, fungal ve viral hastalıklar bulunmaktadır. Bu hastalık etmenlerinin kontrolünde çevre dostu ve insan sağlığına dost, en uygun mücadele yöntemi dayanıklı çeşitler geliştirmektir. Bakteriyel kanser ve solgunluk hastalık etmenine karşı dayanıklı çeşit geliştirmek için NCEBR3 domates hattı kimyasal mutasyona uğratılmıştır. Bu çalışma NCEBR3 hassas domates hattından üretilen dayanıklı M3-9 ve M3-15 domates bitkilerinin tüm genom dizilerini yeni nesil sekanslama (NGS) ile ortaya çıkarmak ve dayanıklılıktan sorumlu gen(ler)i bulmayı amaçlamaktadır. Yapılan yeni nesil sekans analizleri NCEBR3 orijinal hassas, M3-9 ve M3-5 dayanıklı bitkileri arasındaki mutasyonları ve dayanıklılıktan sorumlu 16 adet geni ortaya koymuştur. Bu muhtemel dayanıklılık genlerinin konukçu-patojen ilişkilerine göre çalıştığını, sekonder metabolitler üretimiyle bakteriyel hastalık etmeninin genetik kontrolünü sağladığı anlaşılmıştır. NGS ile elde edilen veriler gelecekte yapılacak çalışmalar için çok değerli sonuçlar vermektedir.



**Anahtara Kelimeler:** Domates, bakteriyel kanser ve solgunluk, mutasyon, dayanıklılık, NGS

**Investigation of Resistant Genes Using Whole Genome Sequence Analyses in Tomato Mutants**


## ABSRACT

Antalya solely produces more than 60% of winter grown tomato production. The tomato plants are treated with bacterial, fungal, and viral diseases that limit the production of this vegetable. The most environmentally and health-friendly method for controlling these pathogens is to develop resistant varieties. For developing resistant tomato plant against bacterial canker and wilt disease, susceptible NCEBR3 tomato line was chemically mutated. This study aims to identify the gene(s) responsible for resistance by using next-generation sequencing (NGS) to extract the complete genome sequences of M3-9 and M3-15 resistant tomato plants derived from the NCEBR3 susceptible tomato line. Next-generation sequencing analyses revealed mutations among the original NCEBR3 susceptible, M3-9, and M3-5 resistant plants, as well as 16 genes responsible for resistance. It has been understood that these potential resistance genes and their function following host-pathogen interactions and providing genetic control of the bacterial pathogen through the production of secondary metabolites. These NGS data analyses have been providing invaluable results for future studies.



**Keywords:** Tomato, bacterial canker and wilt, mutation, resistance, NGS

# 1. GİRİŞ

Küçük ölçekli EMS mutasyonu ile *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* izolat 2 (Cmm2) bakterisine karşı NCEBR3 domates tohumları mutasyona uğratılmıştır. Buradan 15 mutant hattı elde edilmiş olup mutasyona sahip 3. (M3) popülasyonunda M3-9 ve M3-15 bitkileri Cmm2 etmenine karşı dayanıklı fenotipler olup tüm test bitkilerinde herhangi bir açılım bulunmamıştır. Bu M3-9 ve M3-15 mutant bitkileri orijinal NCEBR3 bitkileri ile birlikte sekonder metobolitlerler olan ve dayanıklılıkta rolü bulunan chlorogenic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, rutin hydrate, ferulic acid, quercetin, naringenin ve caempherol seviyeleri Yüksek Performanslı Sıvı Kromotografi (High performance liquid chromatography: HPLC) sistemi kullanılarak analiz edilmiştir. HPLC analizleri M3-9 ve M3-15 bitkilerinde özellikle chlorogenic acid ve rutin hydrate seviyelerinin sırasıyla 6.2 ve 13.6 kat mutant bitkilerde orijinal NCEBR3 bitkisine göre yüksek olduğunu bulunmuştur. Yapılan çalışmalar EMS mutasyonu ve elde edilen M3-9 ve M3-15 mutant bitkilerinin genetik bir dayanıklılığa sahip olduğunu bu dayanıklılık mekanizması içerisinde chlorogenic acid ve rutin hydrate fenolik maddelerinin rol aldığını ortaya koymuştur (Çalış et al., 2012). Yapılan diğer bir çalışmada dayanıklı bulunan M3-9 ve M3-15 mutant domates çeşitlerinin M4 popülasyonunda Cmm2 ile testlenmesi sonucunda M4-9 mutant bitkilerinden test edilen 20 bitkiden 5 tanesi Cmm2'ye karşı hassas fenotipler oluşturmuştur. Buna karşılık Cmm2 ile inokule edilen 20 adet M4- 15 mutant bitkisinin tümü dayanıklı fenotipler göstererek bu bitkilerde bakteriyel solgunluk ve kanser simptomları bulunmamıştır. Patojenisite testlerinden geçirilen M4-15 dayanıklı mutant bitkilerinin tümünden, M4-9 mutantların dayanıklı fenotip gösterenlerden tohumlar alınarak M5 popülasyonları oluşturulmuştur. Hassas fenotipe sahip M4-9 bitkileri atılmıştır. Ümitvar dayanıklı bitkilerden yetiştirilen 20'şer adet M5-15 ve M5-9 domates bitkileri yeniden Cmm2 ile test edildiğinde M5-15 ve M5-9 domates mutantlarının tümünün hassas fenotiplerden oluştuğu bulunmuştur (Çalış et al., 2013). Bakteriyel Cmm'ye genetik olarak dayanıklı bulunan M3-9 ve M3-15 mutantlarının aynı genetik mutasyona mı yoksa farklı genetik mutasyonlara mı sahip olduğunu ortaya koyabilmek için bir diğer çalışmada M3-9 ve M3-15 mutantları birbiriyle melezlenmiştir. Elde edilen F1 melez bitkileri Cmm2 izolatı ile inoküle edildiğinde tüm F1 bitkilerinin hassas olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar M3-9 ve M3-15 mutant bitkilerinin genotiplerinde farklı yerlerde mutasyona sahip olduklarını ve F1 bitkilerinde bu mutant lokuslarındaki farklılık nedeniyle hassas oldukları ispatlanmıştır (Karakaş, H. 2016). Yapılan diğer çalışmayla mutant bitkilerdeki dayanıklılığı sağlayan mekanizmalar arasında önemli bir rolü olan *Patojenisite ile İlgili* (*Pathogenesis related: PR1*) geninin M3-9 ve M3-15 mutant dayanıklı bitkiler üzerindeki üretimini ortaya koymak için Real-Time PCR analizleri yapılmıştır. Dayanıklılık mekanizması içerisinde üretilen *PR1* geni ve bu genin kodladığı proteinler mutant bitkilerde inokulasyondan sonraki 5. güne kadar çok miktarda oluştuğu, buna karşın hassas NCEBR3 bitkilerinde PR1 geni ve onun kodladığı PR1 proteininin üretiminin kısıtlandığı bulunmuştur. Hassas orijinal NCEBR3 bitkilerinde *PR1* genin gecikmeli üretilmesi nedeniyle bakteriyel hastalık etmeni kolonize olurken dayanıklı M3-9 ve M3-15 bitkilerinde inokulasyondan itibaren üretilen *PR1* geni bakteriyel hastalık etmeninin kolonizasyonunu engellemektedir. Yapılan çalışmalar dayanıklılıktan sorumlu gen(ler)in altında bulunan *PR1* geni ve bu genin ürettiği PR1 proteinlerinin iki mutant bitkide dayanıklılığı sağladığını göstermiştir (Karabulut, 1994; Karabulut ve Çalış, 2022). Bakteriyel Cmm ye karşı dayanıklılığı ortaya konan M3-9 ve M3-15 bitkileri farklı genetik zenginliğe (backgrounda) sahip Esin, Newton (Syngenta, Antalya), Alkan, Süvari ve Marmara (Yüksel Tohum, Antalya) ticari domatesleri ile melezlenerek F1 tohumları oluşturulmuştur. Elde edilen M3-15 × Esin ve M3-9 × Süvari melezlerine ait F1 tohumları ekilerek elde edilen bitkiler Cmm2 ile terslenmişlerdir. Her bir F1 popülasyonunda 3//4 bitkinin dayanıklı geri kalan ¼ bitkinin ise hassas olduğu bulunmuş olup hem M3-9 hem de M3-15 bitkilerindeki dayanıklılıktan sorumlu lokus(lar) dominant karakterde dayanıklılığı

sağladığı anlaşılmıştır (Karakaş, 2016, Özdemir 2016). Oluşturulan F1 popülasyonunda en dayanıklı bulunan 10 bitkinin F2 popülasyonunun oluşturmasına izin verilmiş ve $F_2$ popülasyonundaki en dayanıklı ve en hassas 10 bitkiler, orijinal NCEBR1 ile birlikte Esin ve Süvari çeşitleri ebeveyn olarak kullanılarak toplamda 120 den fazla basit sıra tekrarlarından oluşan (Simple sequence repeat) SSR ile (Insertion/Deletion) INDEL markerları kullanılarak M3-9 ve M3-15 mutant bitkilerindeki dayanıklılıktan sorumlu lokus(lar) kromozom üzerindeki yerleri, genotipte haritalanmıştır. Oluşturulan M3-15 × Esin ve M3-9 × Süvari popülasyonlarında dayanıklılık lokuslarının kromozom 5 üzerindeki SL20210_883i SSR markeri ile haritalandığı ortaya konmuştur. Gerek oluşturulan M3-15 × Esin gerekse M3-9 × Süvari popülasyonundaki dayanıklılık lokuslarının aynı SSR primeri ile fenotipteki reaksiyonları genotipte gösteriyor olması nedeniyle farklı haritalama popülasyonlarında dayanıklılıktan sorumlu lokusların 5. no'lu kromozomda bulunması çok anlamlı bulunmuştur (Karakaş, 2016, Özdemir 2016).

Tüm bu aşamaya kadar olan çalışmalar Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesinde yapılan Yüksek Lisans Öğrencileri Tez projeleriyle ve Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünce desteklenen Normal Araştırma Projeleriyle gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ve dayanıklı M3-9 ve M3-15 mutantlarındaki bu genetik özellik gerek örtüaltı gerekse açıkta domates üretiminde bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığının artmasıyla bu dayanıklı bitki tohumları 10 yıl aradan sonra tekrar çalışılmaya başlanmıştır. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Moleküler Mikoloji Laboratuvarında oluşturulan küçük ölçekli bir tohum kaynağındaki bu genetik materyal korunmaktaydı. Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine sunulan bu projeyle bakteriyel etmeninin sebep olduğu kanser ve solgunluk hastalığının genetik kontrolü için yeni nesil sekanslama (Next Generation Sequencing) ile dayanıklılık gen(ler)i araştırılmaya başlanmıştır.

Dayanıklılık lokusunun SL20210_883i SSR markeri ile ilişkilendirilerek yerinin bulunmasından sonra dayanıklılık lokuslarının haritalanan yerde hangi gen ile polimorfizm gösterdiğini ortaya koyabilmek için Illumina HiSeq yeni nesil sekanslama teknolojisini kullanarak M3-9, M-15 dayanıklı mutant bitkileri ile NCEBR3 hassas bitkisi arasındaki polimorfizm gösteren spesifik markırlar bulunarak dayanıklılıktan sorumlu gen(ler) araştırılmaya başlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Domates Dünya'nın birçok bölgesinde yüksek miktarda yetiştiriciliği ve tüketimi yapılan tarımsal anlamda en önemli bitkiler arasında bulunmaktadır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organisation of the United Nations: FAO) verilerine göre dünya genelinde 2023 yılı itibarıyla domates 5.030.545 ha alanda 180.766.329 ton üretilmiştir. Türkiye ise 181.488 ha alanda 12.841.990 ton'luk domates üretimiyle Dünyada 3. sırada bulunmaktadır (Anonim, 2021a). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre ise Türkiye 2020 yılında 13.204.015 ton'luk bir üretim miktarına sahiptir (Anonim, 2021b). Domates bitkileri açık ve kapalı üretim alanlarında yüksek üretim miktarına sahip olmasının yanında funguslar, bakteriler, virüsler ve viroidler gibi birçok biyotik hastalık etmenleri tarafından büyük miktarlarda zarara uğratılmaktadırlar. Bakteriyel patojenler arasında yer alan bakteriyel solgunluk ve kanser hastalığı etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) özellikle sıcaklığın ve nemin yüksek olduğu tropikal ve subtropikal bölgelerde domates üretimini kısıtlayan domatesin en önemli hastalıklarından birisidir. Patojen yaz aylarına nazaran kış aylarında toprakta canlılığını daha yüksek süre ile muhafaza etmektedir. Hastalık bitkilerde kanser ve solgunluk belirtileri göstererek domates bitkilerinin tamamen ölümüne sebebiyet vermektedir. Enfeksiyon doğrudan iletim demetleri dokusuna yerleşen inokulumdan kaynaklandığında sistemik enfeksiyon özellikle genç bitkilerde

solgunluk belirtisi ile kendini göstermektedir. Yaşlı bitkilerde ise solgunluk belirtileri genç bitkilere oranla daha yavaş ve aşamalı olarak ortaya çıkmaktadır. Enfekteli gövdelerde iletim demetleri ilerleyen zamanlarda kahverengi görünüm almaktadır. Ayrıca patojenin floem ve parankima hücrelerine yayılması ile hastalığa yakalanan bitki gövde ve petiollerinde lekelenmeler, koyulaşarak bazı durumlarda da gövde üzerinde çatlaklar oluşmaktadır. Hastalık etmeninin bitki yüzeyindeki açıklıklar ile girişi gerçekleşmiş ise nekrozlar ve yaprak lekeleri gibi lokal belirtiler görülür. Bu lekelenmeler gittikçe artarak yaprak yüzeyinin büyük bölümünü kaplayarak yanmış bir görünüm oluşturmaktadır. Domates meyvelerinde ise patojen kuş gözü lekesi adı verilen lokal kahverengi belirtiler oluşturarak meyvenin pazar değerini düşürmektedir. (Agrios, 2007; Bergüzar ve ark., 2018; Çalış ve ark., 2013; Çetinkaya-Yıldız, 2007). Hastalık etmeninin bu derece yüksek öneme haiz olmasına rağmen günümüzde etkin kültürel, biyolojik ya da kimyasal bir mücadelesi bulunmamaktadır. Ancak antagonistik bakteriler, sodyum hipoklorit, laktik asit gibi alternatif uygulamaların özellikle domates tohumlarındaki hastalık gelişimi üzerinde sınırlandırıcı etkilere neden olarak bitkilerdeki patojen miktarının azaltılmasında etkili olduğu tespit edilmiştir. Hastalıkla mücadele de bitkiyi koruyucu amaçlı kimyasal uygulamalar yapılabilmektedir. Ancak bu uygulamalar çevre ve insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere yol açmaktadır. Bütün bu etkenler göz önüne alındığında hastalık etmeni patojenle kalıcı ve etkin bir mücadele yürütmek için en öncelikli konu dayanıklı bitki çeşidi geliştirilmesine yönelik çalışmalardır (Çalış ve ark., 2013; Karut ve ark., 2019).

Cmm patojeni konukçu uygunluğunu test ederek konukçu bitki üzerinde çoğalma faaliyetine başlamaktadır. Dolayısı ile moleküler mekanizmalarının anlaşılması, konukçu-patojen ilişkisinin ortaya konulmasıyla mümkündür. Konukçunun dayanıklılık gen(ler)inin kontrol ettiği hücre içerisindeki süper oksit patlamaları ve bunların yol açtığı hipersensitif hücre ölümü (HR), dayanıklılık gen(ler)inin aktive ettiği patojene özel proteinlerin (Pathogenesis related (PR) proteins) oluşumu ve sekonder metobolitlerin üretilmesi, patojene karşı oluşturulacak sistemik kazanılmış dayanıklılıkta görev alan salisilik asit, jasmonik asit ve etilen gibi bitki büyüme düzenleyicilerinin miktarındaki artışlar konukçu bitkide var olan dayanıklık gen(ler)i tarafından kontrol edilmektedir (Wang ve ark., 2007; Yun ve Loake, 2002; Robert-Seilaniantz ve ark., 2007; Alvarez, 2004). PR1 genlerinin kodladığı proteinler bitkilerde patojenin enfeksiyonu, yaralanma, incinme, yüksek osmotik basınç gibi stres koşullarında oluşturularak patojenin saldırısını, yayılmasını ve çok yönlülüğünü sınırlandırmaktadırlar (Uknes ve ark., 1992). Hassas domates bitkilerinde klasik Mendel testlerinin ters bir şekli (reverse genetics) olan ethyl metanosulfonate (EMS) mutasyonu uygulaması ile gerçekleştirilen bakteriyel kanser hastalık etmenine karşı dayanıklı olan M3-9 ve M3-15 bitkilerinde meydana gelen ve dayanıklılığa neden olan genetik değişikliklerin belirlenmesi bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır.

## 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Projede 2010 yılından bu yana EMS mutasyonla geliştirilen M3-9, M-15 mutantları ve orijinal NCEBR3 domates hattı kullanılacaktır. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Moleküler Mikoloji Laboratuvarı'nda saklanan domates tohumları steril torflara ekilmiş, buradan gelişen M3-9, M3-15 ve NECEBR3 bitkilerinden toplam genomik DNA izole edilmiştir. Bitkilerden toplam genomik DNA eldesi saksılarda sağlıklı bir şekilde geliştirilen M3-9, M3-15 ve NCEBR3 bitkilerinden DNA izolasyonu CTAB yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Doyel and Doyle, 1991). DNA izolasyonu için yaprak örnekleri 1 g yaprak örneği 1,5 mL'lik Ependorf tüplere konulmuş ve üzerine 600 µL CTAB tamponu (%2 CTAB, 100 mM Tris - HCl, 20 mM EDTA, 1,2 M NaCl, %1 PVP) eklenmiştir. Lizizin gerçekleştirilmesi için karışım 65 °C'de 45 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürecinden sonra karışım üzerine 600 µL kloroform : izoamilalkol (24:1) eklenmiş ve

karıştırıldıktan sonra 13000 rpm'de 10 dk santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüjden sonra tüpteki supernatant'tan 400 µL yeni tüpe alınmış ve üzerine 400 µL saf isopropanol eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra 5 dk boyunca –20 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürecinden sonra karışım 13000 rpm'de 10 dk santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj işleminden sonra tüpteki supernatant dökülmüş ve pellet 200 µL -20 °C de soğutulmuş etanol ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra izole edilen DNA örnekleri kurutulmuştur. Kurumuş DNA üzerine 100 µL 1X TE buffer eklenmiştir. İzole edilen DNA küçük fragmanlardan arındırmak için 100 µL %9 PEG (%9 PEG 8000, 1 M NaCl, 10 mM Tris - HCl) ile karıştırmış ve 10000 rpm'de 30 dakika boyunda santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj işleminden sonra supernatant dökülmüş ve pellet üzerine 200 µL etanol eklenmiştir. Yıkama işleminden sonra sıvı dökülmüş ve pellet kurumaya bırakılmıştır. Kurumuş DNA üzerine 100 µL 1X TE buffer eklenmiş ve çözdürüldükten sonra –20 C'de muhafaza edilmiştir. İzole edilen DNA'nın konsantrasyonu NanoDrop ile ölçülmüş ve DNA kalitesi %0.8'lik agaroz jelde, 1 saat ve 75 V'ta 5 µL DNA yürütülerek kontrol edilmiştir. Mutant ve orijinal domates DNA larının sekanslamaya hazırlanması, izolasyonu tamamlanan yüksek molekül ağırlığına sahip DNA'lar 10 ng/µL olacak şekilde seyreltilmiş ve kesim sonrası 2 veya 3 nükleotid açıkta bırakacak bir restriksiyon enzimi kullanılarak DNA'lar kesilmiştir. Kesim bölgelerine, kullanılan restriksiyon enziminin barkodlu adaptörü yapıştırılmıştır. Barkodlu fragmentler daha sonra Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) purifikasyon kiti ile temizlenmiştir. PZR pürifikasyonu sonrası alınan fragmentlerin barkodlu adaptörün primeri ile PZR'leri gerçekleştirilmiş ve elde edilen kütüphane, sekanslama kütüphanesi oluşturulmuştur. Bu kütüphane daha sonra HiSeq2500 (Illumina) sekanslama sisteminde kullanılmıştır (Bentley vd., 2008). Sekanslama işlemleri için DNA'lar Genome Tarımsal Tanı ve AR-GE Danışmanlık Firmasından Hizmet Alımı şeklinde yapılmıştır. Firma tarafından domates DNA örnekleri yeni nesil dizilime (NGS) Illumina Platform sisteminde 30X derinliğinde tüm genom dizileme (Whole genome sequencing) ve data analizleri yapılmıştır. Genom sekans analizleri Genom sekans analizi yapılacak olan domates DNA ları Illumina Platformda sekanslanmıştır.

Genom sekans verilerinin analizleri sekans okumaları kalite açısından kontrol edilerek ve Trimmomatic kullanılarak kırpılmıştır (Bolger vd., 2014). Kırpılmış okumalar Bowtie kullanılarak referans domates genomuna karşı hizalanmış ve Genome Analysis Toolkit (GATK) programı kullanılarak SNP ve INDEL varyantları belirlenmiştir. Belirlenen SNP'ler, filogenetik ağaç oluşturmak için kullanılmış ve 3 bitkinin genetik yapısındaki değişiklikler eş zamanlı belirlenmiştir. GWAS analizleri için SNP verileri %80 call rate e göre ve %5 missing data ya göre filtrelenmiştir. Genotip verileri ile SNP verileri arasında ilişki kurmak için Multiple linear model, MLM (Yu vd., 2006) kullanılmıştır. MLM de oluşabilecek "yanlış doğruları" önlemek için kinship ve PCA (MLM + K ve MLM +PCA) kullanılmıştır. Kinship matriks ve PCA elde etmek için "R" studio" programında "dist" fonksiyonu kullanılmıştır. TASSEL V5 programı MLM + K ve MLM +PCA modellerinin analizi için kullanılmış (www.maizegenetics.net), elde edilen R2 verilerinin istatistiki açıdan önemli olmalarının hesaplanmasında "false pozitif"lerin engellenmesi için False Discovery Rate ve Bonferroni correction kullanılmıştır. Tüm bu analizler için istatitiski programlar başarılı ile uygulanmıştır. Kromozomal yeniden düzenlemeler, genom evriminin önemli itici güçleridir. Çalışma kapsamında elde edilen genomik veriler Smash++ ve RagTag/RaGOO kullanılarak karşılaştırılmıştır ve genomik yeniden düzenlemeler için değerlendirilmiştir (Hosseini vd., 2020; Alonge vd., 2019 ve 2022). Birleştirilmiş genom sekansları karşılaştırılmış ve SweeD kullanılarak seçici tarama (Selective Sweep) analizleri yapılmıştır (Pavlidis vd., 2013). Seçici taramaların bulunduğu aday genlerin +/- 5 Kb koordinatları belirlenmiştir. Son aşamada dN/DS oranı hesaplanarak SNP'lerin kodlayan genlerin ve transpozon insersiyonu üzerine etkileri belirlenmiştir.

## 4. BULGULAR

Proje çalışmasında toplamda orijinal EBR3 domates bitkilerinde 748613, M3-9 mutant bitkisinde 1109723 ve M3-15 mutant bitkisinde 1370294 mutasyon bulunmuş olup bu mutasyonların sırasıyla orijinal EBR3, M3-9 ve M3-15 bitkilerinde dağılımları Insertion/Deletion (INDEL) markırları için 42678, 58995 ve 77762 iken, tek mutasyon polimorfizimine sahip (Single nucleotide polymorphism: SNP) markırları 690758, 1028343 ve 1263340 adet mutasyon değişiminden kaynaklandığı bulunmuştur. Bakteriyel kanser ve solgunluk hastalık etmenine hassas EBR3 domates, M3-9 ve M3-15 dayanıklı mutant bitkileri arasındaki genetik farklılığın toplam 3228630 adet mutasyon sonucunda oluştuğu açık olarak ortaya konarken, M3-9 mutant bitkisinde 22385 diğer M3-15 mutant bitkisinde 29192 noktada yerine yeni bir nükleotit koyma (substitution) gerçekleştiği anlaşılmıştır. Yeni nesil sekanslama (Next Generation Sequencing: NGS) ile original EBR3, M3-9 ve M3-15 mutant bitkilerindeki her bir kromozom üzerindeki nükleotit değişikliği açıkça ortaya konmuştur (Tablo 1).

Tablo 1. Orijinal EBR3, M3-9 ve M3-15 mutant bitkilerinde genomik sekanslama sonucunda ortaya konan mutasyonların kromozomlar üzerindeki dağılımları.

| Sample | Region | Mutation Type | Chr 1 | Chr 2 | Chr 3 | Chr 4 | Chr 5 | Chr 6 | Chr 7 | Chr 8 | Chr 9 | Chr 10 | Chr 11 | Chr 12 | Total |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| M3-15 | on genomic site | Deletion | 840 | 2,302 | 1,523 | 2,243 | 5,137 | 152 | 2,702 | 229 | 658 | 310 | 2,560 | 748 | 19,404 |
| | | Deletion (tandem repeat) | 1,346 | 3,186 | 1,953 | 2,073 | 6,344 | 278 | 2,155 | 414 | 762 | 508 | 3,507 | 1,203 | 23,729 |
| | | Insertion | 741 | 1,999 | 1,567 | 2,103 | 4,406 | 175 | 2,379 | 257 | 565 | 262 | 2,133 | 724 | 17,311 |
| | | Insertion (tandem repeat) | 985 | 2,154 | 1,448 | 1,584 | 4,462 | 220 | 1,715 | 318 | 647 | 407 | 2,459 | 919 | 17,318 |
| | | SNP (transition) | 27,615 | 106,377 | 53,247 | 52,610 | 238,876 | 8,882 | 50,077 | 8,400 | 15,151 | 12,269 | 109,382 | 33,988 | 716,874 |
| | | SNP (transversion) | 19,468 | 84,646 | 38,984 | 36,486 | 202,306 | 6,283 | 28,767 | 5,327 | 7,791 | 8,969 | 81,684 | 25,755 | 546,466 |
| | | Substitution | 942 | 3,412 | 2,092 | 2,933 | 10,370 | 229 | 3,268 | 290 | 581 | 398 | 3,532 | 1,145 | 29,192 |
| M3-9 | on genomic site | Deletion | 622 | 1,826 | 1,123 | 1,590 | 4,133 | 121 | 1,901 | 172 | 479 | 236 | 2,102 | 527 | 14,832 |
| | | Deletion (tandem repeat) | 1,013 | 2,477 | 1,458 | 1,506 | 4,875 | 218 | 1,467 | 296 | 535 | 367 | 2,723 | 950 | 17,885 |
| | | Insertion | 555 | 1,569 | 1,123 | 1,486 | 3,388 | 139 | 1,574 | 205 | 399 | 218 | 1,585 | 521 | 12,762 |
| | | Insertion (tandem repeat) | 741 | 1,785 | 1,162 | 1,176 | 3,548 | 181 | 1,245 | 233 | 487 | 280 | 1,931 | 747 | 13,516 |
| | | SNP (transition) | 21,872 | 88,283 | 42,550 | 40,354 | 198,137 | 7,374 | 36,912 | 6,474 | 11,535 | 9,563 | 90,329 | 27,607 | 580,990 |
| | | SNP (transversion) | 15,573 | 70,784 | 31,642 | 28,312 | 168,041 | 5,270 | 21,361 | 4,127 | 5,937 | 6,969 | 68,221 | 21,116 | 447,353 |
| | | Substitution | 696 | 2,799 | 1,477 | 2,052 | 8,337 | 188 | 2,195 | 212 | 387 | 304 | 2,864 | 874 | 22,385 |
| EBR3 | on genomic site | Deletion | 577 | 1,513 | 915 | 1,550 | 3,266 | 96 | 1,578 | 149 | 418 | 186 | 341 | 274 | 10,863 |
| | | Deletion (tandem repeat) | 783 | 2,045 | 1,118 | 1,465 | 3,787 | 163 | 1,281 | 274 | 489 | 317 | 437 | 473 | 12,632 |
| | | Insertion | 435 | 1,326 | 878 | 1,434 | 2,618 | 117 | 1,293 | 173 | 333 | 163 | 331 | 317 | 9,418 |
| | | Insertion (tandem repeat) | 633 | 1,492 | 878 | 1,117 | 2,841 | 149 | 1,042 | 222 | 359 | 265 | 358 | 409 | 9,765 |
| | | SNP (transition) | 17,648 | 70,992 | 31,887 | 37,351 | 153,797 | 5,665 | 30,808 | 5,423 | 9,702 | 7,919 | 8,484 | 12,887 | 392,563 |
| | | SNP (transversion) | 12,541 | 55,997 | 23,444 | 25,435 | 130,594 | 4,065 | 17,856 | 3,396 | 5,020 | 5,922 | 4,939 | 8,986 | 298,195 |
| | | Substitution | 544 | 2,059 | 1,142 | 1,771 | 6,270 | 134 | 1,782 | 185 | 325 | 257 | 286 | 422 | 15,177 |

Tablo1 incelendiğinde her bir kromozom üzerinde çok sayıda mutasyonun gerçekleştiği açıkça anlaşılmakta olup en fazla mutasyonun bizim önceki çalışmalarda haritalama yaptığımız 5 no'lu ve 11 numaralı kromozomlarda gerçekleştiği anlaşılmaktadır. NGS sonuçlarına göre kromozom 5 üzerinde EBR3, M3-9 ve M3-15 bitkilerinde sırasıyla 153797, 238876 ve 198137 adet pirimidin den pürin nükleotidine geçiş (transition) mutasyonu belirlenirken yine bu bitkilerde pürinden pirimidin nükleotidine geçiş (transversion) mutasyonu sayıları sırasıyla 130594, 202306 ve 168041 olarak bulunmuştur. Domates

bitkilerindeki bir mutasyon değişimi 2 şekilde olmaktadır; bunlar pürin nükleotidinin bir diğer 2 halkalı pürin (A ↔ G) nükleotidine (translation) ya da 2 halkalı pürin (A ↔ G) nükleotidinin tek halkalı pirimidin (C, T) nükleotidine (transversion) şeklinde gerçekleşmektedir.

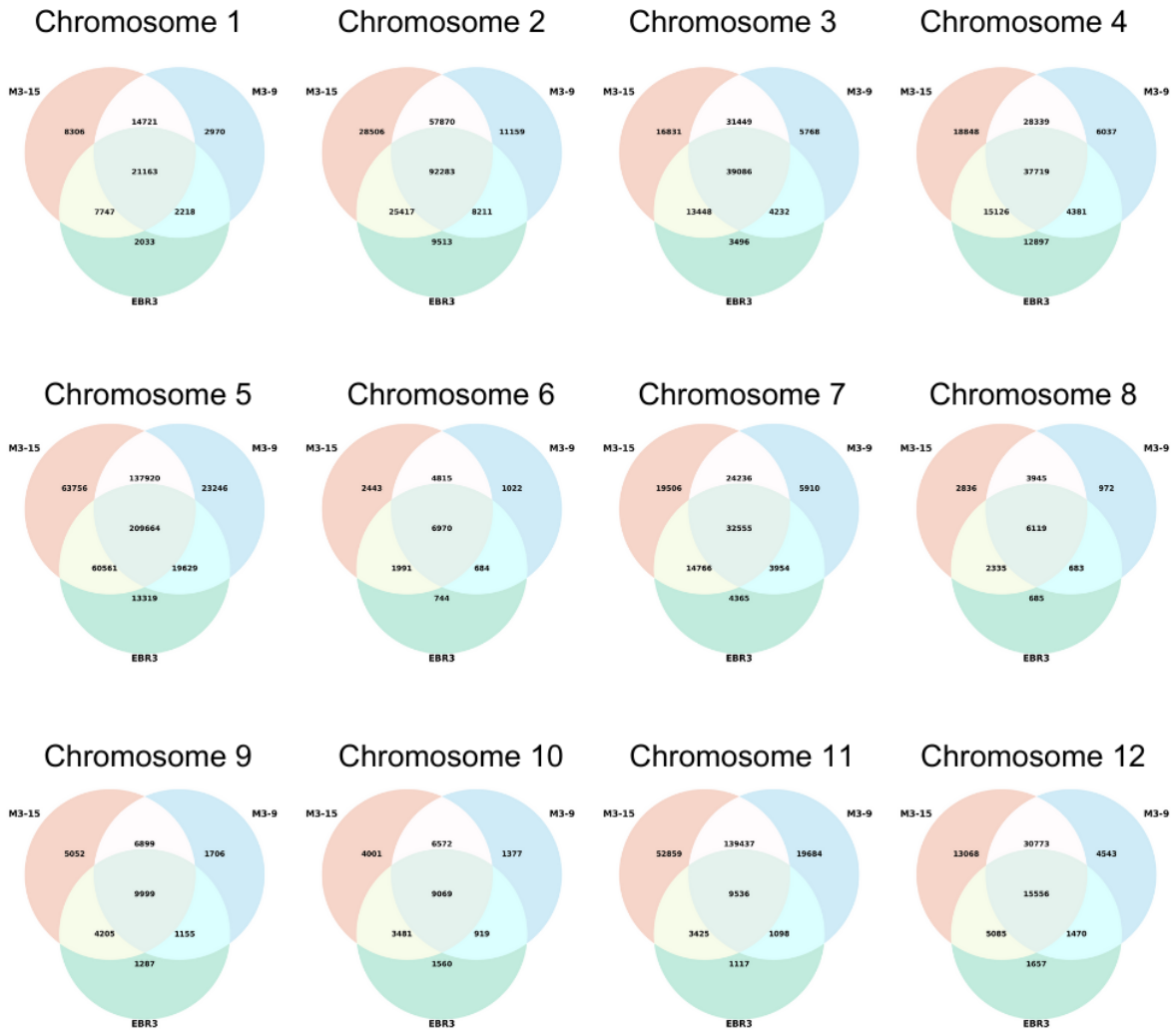
Bu çalışmaya konu olan orijinal NCEBR3 domates bitkilerine uygulanan ethylmethanosufonate kimyasalı sonucunda hem translation hem de transversion mutasyonları oluşturulmuştur. Burada olan kimyasal mutasyonlar için transversion için iki yol varken transition için sadece bir mümkün yol vardır. Çünkü tek halkalı yapının diğer tek halkalı nükleotide çevrilmesi tek halkalı nükleotid yapısının çift halkalı yapıya dönüşmesi daha kolay olmaktadır. Transition değişimleri amino asitlerin değişiminde daha az etkiye sahip olup bu değişime 'sessiz değişim: silent substitutions' denilmektedir. Burada transversion genellikle transition dan daha etkili olup kodondaki ikinci ve üçüncü pozisyondaki nükleotidlere dolayısıyla oluşacak farklı amino asitlere sebep olmaktadır. Ne zaman bir mutasyon gerçekleşirse bu mutasyon amino asitin değişmesine, amino asitlerin oluşturduğu protein yapısının, aktivitesinin ve hücre içerisindeki özelliklerine değişmesine sebep olmaktadır. Bu durumda oluşan mutasyonların protein yapısına etkisi bakıldığında orijinal EBR3, M3-9 ve M3-15 bitkileri arasında toplamda 65003 protein yapısında değişim olduğu bulunmuştur. Bu değişen protein yapılarının dağılımları Tablo 2'de verilmiştir. Bu tabloda toplamda sırasıyla EBR3 orijinal bitkisinde 16065, M3-9 bitkisinde 21687 ve M3-15 bitkisinde 27251 protein yapısının değiştiği açıkça bulunmuştur. Protein yapıları değişen bitkilerde yerine koyma (substituiton), susturma (silent), ucunu kesme (truncation), çerçeve kayması (frame shift), uzama (extension), silme (deletion) ve start kodonun kaybolması (Start codon loss) şeklinde mutasyonlar olduğu bulunmuştur (Tablo 2). Tüm oluşan yeni proteinleri kodlayan yapılardaki değişimlerin kaynağı ve kantitatif sayıları açıkça Tablo 2 de verilmiştir.

**Tablo 2**. Mutasyonlar sonucu protein yapıları değişen her bir bitkide oluşan yeni proteinlerin kaynakları.

| | **EBR3** | **M3-9** | **M3-15** |
|---|---|---|---|
| Substitution | 8575 | 11786 | 14737 |
| Silent | 7001 | 9204 | 11603 |
| Truncation | 182 | 303 | 379 |
| Frame Shift | 137 | 182 | 267 |
| Extension | 60 | 79 | 101 |
| Deletion | 52 | 62 | 77 |
| Start Codon Loss | 33 | 37 | 48 |
| Insertion | 25 | 34 | 39 |

NGS analizlerinde mutasyon sonucu bulunan protein değişiklikleri orijinal EBR3, M3-9 ve M3-15 mutant bitkilerine kromozomlar üzerinde dağıtıldığında Şekil 1 oluşturulmuştur. Her bir kromozom üzerindeki proteinler ile bu proteinlerin orijinal EBR3, M3-9 ve M3-15 bitkilerindeki durumları grafik olarak ifade edilmiştir (Şekil 1). Açıkça Şekil 1 den anlaşıldığı gibi protein düzeyinde de en fazla mutasyon kromozom 5 ve kromozom 11 de bulunmuştur. Elde edilen NGS sonuçlarının analizleri daha önce elde edilen haritalama sonuçlarıyla birebir örtüşmektedir. NGS analizlerinde dayanıklılık gen yapıları kromozom 5 üzerinde yoğunlaşmakta olup bu NGS sonuçlarının 12 yıl önce yapılan mutasyonun ve elde edilen mutantların ticari çeşitlerle yapılan haritalamaların doğruluğunu göstermektedir. Haritalamadan sonra geçen 11 yıl içinde domates genomundaki bilgiler artarak dayanıklılık genlerinin kromozom 11 ile olan ilişkileri detaylandırılmıştır.

Bu çalışmada elde edilen NGS sonuçları EMS mutasyonu sonucunda oluşan homozigot mutasyon etkilerinden kaynaklanan M3-9 ve M3-15 bitkilerindeki protein oluşumları Tablo 3 de verilmiştir.




**Şekil 1.** Orijinal EBR3, M3-9 ve M3-15 bitkilerinde kromozom düzeyinde oluşan mutasyonların Venn diagramıyla gösterilmesi.

NGS analizleri oluşan sessiz mutasyonları protein oluşumlarına katmadan bakıldığında M3-9 ve M3-15 mutant bitkilerinde sırasıyla nükleotit ilavesi sonucu (substitution) 5762 ve 7360 protein, kesme sonucunda (Truncation), 171 ve 216 protein, çerçeve kayması sonucunda (Frame shift) 106 ve 169 protein, silme sonucunda (Deletion) 49 ve 57 protein, uzama sonucunda (Extension) 35 ve 54 protein, ilave sonucunda (Insertion) 24 ve 54 protein ve başlangıç kodonu kaybı sonucunda (Start Codon Loss) 19 ve 27 protein oluşumu gerçekleştiği açıkça anlaşılmaktadır. Genel toplam olarak EMS mutasyonu sonucu M3-9 ve M3-15 bitkilerinde oluşan yeni protein sayısı sırasıyla 6166 ve 7912 olduğu görülmektedir (Tablo 3).

**Tablo 3.** EMS mutasyonu sonucu oluşan homozigot mutasyonların M3-9 ve M3-15 bitkilerinin protein yapılarında oluşturduğu değişimler.

| **Mutasyon Tipi** | **M3-9** | **M3-15** |
|---|---|---|
| Substitution | 5762 | 7360 |
| Truncation | 171 | 216 |
| Frame Shift | 106 | 169 |
| Deletion | 49 | 57 |
| Extension | 35 | 54 |
| Insertion | 24 | 29 |
| Start Codon Loss | 19 | 27 |
| **Toplam** | 6166 | 7912 |

NGS analizleri EMS mutasyonu sonucunda M3-9 ve M3-15 bitkilerinde yeni dayanıklılık genlerinin oluştuğunu ve bu dayanıklılık genlerinin kodladıkları protein yapılarının orijinal NCEBR3 hassas domates bitkisinin protein yapılarından farklı olduğunu ortaya çıkarmıştır. EMS mutasyonunun yeni oluşturduğu protein yapılarının neler olduğunu ortaya koyabilmek için, NGS analizlerinde dayanıklılık ile genetik olarak ilişkilendirilmiş genleri inceledik. Çalışmada genel olarak ilişkilendirilmiş dayanıklılık genleri listesinden ziyade bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığı ile ilişkilendirilmiş genler ve bunların fonksiyon olarak bağlantısı bulunan dayanıklılık genleri üzerinde yoğunlaşılmıştır. Muhtemel dayanıklılık genleri domates genomu üzerinde yer alan genom çapında ilişkilendirme çalışmalarında (genome-wide association studies: GWAS) ve aday dayanıklılık genlerini bulma sürecinde genler farklı fonksiyonlara sahip gen familyalarından seçilmiştir. Yapılan GWAS analizlerinde bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığına dayanıklılık genleri 4 kategoride sınıflandırılmıştır (Tablo 4).

Gen Ontolojisi (GO) bilim insanları tarafından oluşturulan biyolojik bilginin standart bir şekilde sunulmasını sağlayan bir sistemdir. GO aynı zamanda daha önce tanımlanan sınıfları (=*classes*) içermekte olup her bir canlıyı diğer canlı ile tanımlanan ilişkilerini göstermektedir. GO ismi türlerin bilinmeyen yapıları için dizayn edilmiş olup türlerin gen ürünlerini içeren canlılığın tüm soyağacını kapsamaktadır. Bilgisayar destekli çerçeve analizleri GO içerisinde ilgili genleri açıklama getirebilir, fonksiyonlarını diğer organizmalarla mukayese edebilir ve farklı biyolojik veri tabanlarındaki bilgilerin birleşimiyle karşılaştırmalar yapabilmektedir. Bu GO bilimi 3 ana temel üzerine kurulmuş olup bu temeller: Moleküler fonksiyon (Molecular Function: MF), Hücre İçerikleri (Cellular Compenent: CC) ve Biyolojik süreçlerdir (Biological Process: BP).

Moleküler Fonksiyon: Gen ürünlerinin moleküler seviyedeki aktivitelerini örneğin 'kataliz' ya da 'traskripsiyon düzenleyici aktivite' içermektedir. Gen ürünleri olan protein ya da RNA içermekte olup bazı gen ürünleri moleküler çok kompleks ürünler oluşturmaktadır. Bu kompleks aktiviteler tek bir gen ürünü olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle daha geniş aktiviteler olarak katalitik aktivite ve transporter aktivite olarak spesifik adenilate cyclase aktivitesi ve insulin reseptör aktivite olarak tanımlanmaktadır. GO Moleküler fonksiyon kelimesi aktiviteleri temsil etmekte olup oluşan aktivitenin mevcudiyetini göstermemektedir. Bu nedenle gen ürünlerinin isimleri ve onların moleküler aktivitelerinin karmaşıklığa sebebiyet vermemesi gerekmektedir. GO Moleküler fonksiyonları aktivite kelimesiyle birlikte olup protein kinase GO moleküler fonksiyonu olarak Protein Kinase aktivitesini göstermektedir. Sonuç olarak Moleküler Fonksiyon nerede, ne zaman ya da ne yapıda aksiyonun gerçekleşeceğini belirtmemektedir. Hücre İçeriklerinde ise hücre içerisinde gen ürününün nerede moleküler fonksiyon göstereceğini hücre içeriği belirlemektedir. Hücre

içerikleri (CC) hücredeki anatomik yapıları, hücreden geçen örneğin hücre zarından ve hücre iskeletinden geçenleri belirtmektedir. Biyolojik süreçler Biyolojik programlardan daha fazlası olup çok sayıda moleküler aktiviteleri içermektedir. Örneğin DNA tamiri ya da sinyal iletimi gibi biyolojik süreçleri kapsamakta olup sitozin biyosentetetik yapılarının oluşumu ya da D-glukoz trasnmembran taşınımı gibi süreçleri belirtmektedir.

NGS analizleri M3-9 ve M3-15 mutant bitkilerindeki GO Biyolojik süreçlere bakılarak 18 adet gen ürünü ile ilişkilendirilirken Moleküler fonksiyonlarına göre bu 18 gen ürünün farklı fonksiyonlara sahip olduğunu açıkça ortaya koymaktadır (Tablo 4).

**Tablo 4.** M3-9 ve M3-15 mutant bitkilerinde gen ontolojisi zenginleştirme ve olasılık (Probability: p) değerinin karşılaştırılması.

| Category | Term | M3-9 Count | M3-9 p | M3-15 Count | M3-15 p | Common Count | Common p |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Biological Process | Plant defense | 49 | 0 | 53 | 0 | 47 | 0 |
| Biological Process | Hypersensitive response | 12 | 0.02 | 11 | 0.05 | 12 | 0.01 |
| Biological Process | Alkaloid metabolism | 7 | 0.04 | 7 | 0.46 | 6 | 0.08 |
| Biological Process | Differentiation | 6 | 0.08 | 8 | 0.01 | 6 | 0.06 |
| Biological Process | Hydrogen peroxide | 8 | 0.14 | 10 | 0.03 | 8 | 0.1 |
| Biological Process | Flowering | 3 | 0.15 | 4 | 0.03 | 3 | 0.13 |
| Biological Process | Phenylpropanoid metabolism | 6 | 0.2 | 5 | 0.38 | 5 | 0.33 |
| Biological Process | RNA-mediated gene silencing | 5 | 0.2 | 4 | 0.42 | 4 | 0.17 |
| Biological Process | Amino-acid transport | 6 | 0.24 | 6 | 0.24 | 6 | 0.19 |
| Biological Process | Meiosis | 3 | 0.25 | 3 | 0.25 | 3 | 0.22 |
| Biological Process | rRNA processing | 0 | 0 | 5 | 0.05 | 0 | 0 |
| Biological Process | Translation regulation | 4 | 0.29 | 5 | 0.12 | 4 | 0.25 |
| Biological Process | Endocytosis | 3 | 0.3 | 3 | 0.3 | 3 | 0.26 |
| Biological Process | Transcription | 59 | 0.9 | 72 | 0.92 | 54 | 0.9 |
| Biological Process | Transport | 62 | 1 | 85 | 0.95 | 55 | 1 |
| Biological Process | Ion Transport | 15 | 0.37 | 15 | 0.81 | 14 | 0.36 |
| Biological Process | Cytokinin signaling pathway | 0 | 0 | 3 | 0.15 | 0 | 0 |
| Biological Process | mRNA processing | 9 | 0.36 | 9 | 0.36 | 9 | 0.28 |
| Molecular Function | Ion channel | 10 | 0.01 | 10 | 0.17 | 10 | 0.01 |
| Molecular Function | Kinase | 66 | 0.05 | 87 | 0.01 | 61 | 0.06 |
| Molecular Function | Serine/threonine-protein kinase | 28 | 0.12 | 34 | 0.26 | 26 | 0.12 |
| Molecular Function | Ligase | 11 | 0.15 | 12 | 0.71 | 11 | 0.1 |
| Molecular Function | Carboxypeptidase | 4 | 0.16 | 4 | 0.17 | 4 | 0.14 |
| Molecular Function | Glycosyltransferase | 26 | 0.17 | 29 | 0.07 | 24 | 0.19 |
| Molecular Function | Hydrolase | 99 | 0.18 | 118 | 0.07 | 90 | 0.22 |
| Molecular Function | Acyltransferase | 11 | 0.2 | 15 | 0.34 | 11 | 0.14 |
| Molecular Function | Helicase | 13 | 0.21 | 16 | 0.05 | 13 | 0.14 |
| Molecular Function | Glycosidase | 23 | 0.22 | 28 | 0.26 | 21 | 0.25 |
| Molecular Function | Peroxidase | 10 | 0.3 | 12 | 0.12 | 10 | 0.22 |
| Molecular Function | Transferase | 149 | 0.5 | 192 | 0.15 | 138 | 0.46 |
| Molecular Function | Developmental protein | 6 | 0.47 | 8 | 0.17 | 5 | 0.6 |
| Molecular Function | Protease | 17 | 0.31 | 18 | 0.25 | 15 | 0.4 |
| Cellular Component | Cell membrane | 42 | 0 | 48 | 0 | 39 | 0 |
| Cellular Component | Secreted | 39 | 0.01 | 44 | 0.03 | 36 | 0.01 |
| Cellular Component | Cytoplasm | 39 | 0.09 | 48 | 0.14 | 38 | 0.05 |
| Cellular Component | Nucleus | 108 | 0.11 | 136 | 0.19 | 97 | 0.18 |
| Cellular Component | Apoplast | 9 | 0.28 | 10 | 0.66 | 9 | 0.21 |
| Cellular Component | Golgi apparatus | 15 | 0.38 | 21 | 0.19 | 15 | 0.25 |
| Cellular Component | Mitochondrion | 8 | 0.97 | 5 | 1 | 7 | 0.97 |
| Cellular Component | Chloroplast | 14 | 0.99 | 14 | 1 | 12 | 1 |
| Cellular Component | Chromosome | 5 | 0.83 | 7 | 0.58 | 4 | 0.9 |
| KEGG | Biosynthesis of secondary metabolites | 128 | 0.01 | 159 | 0.02 | 116 | 0.02 |
| KEGG | Homologous recombination | 10 | 0.03 | 9 | 0.07 | 11 | 0.01 |
| KEGG | Zeatin biosynthesis | 9 | 0.08 | 13 | 0 | 9 | 0.05 |
| KEGG | Fatty acid elongation | 6 | 0.1 | 6 | 0.11 | 6 | 0.07 |
| KEGG | Plant-pathogen interaction | 23 | 0.12 | 29 | 0.07 | 22 | 0.8 |
| KEGG | ATP-dependent chromatin remodeling | 9 | 0.13 | 6 | 0.62 | 7 | 0.33 |
| KEGG | RNA degradation | 13 | 0.14 | 14 | 0.1 | 13 | 0.09 |
| KEGG | Fatty acid biosynthesis | 7 | 0.14 | 7 | 0.16 | 7 | 0.11 |
| KEGG | Base excision repair | 7 | 0.17 | 8 | 0.1 | 7 | 0.13 |
| KEGG | Glycine, serine and threonine metabolism | 8 | 0.2 | 6 | 0.57 | 7 | 0.28 |
| KEGG | Lysosome | 8 | 0.43 | 11 | 0.11 | 8 | 0.34 |
| KEGG | Sesquiterpenoid and | 3 | 0.55 | 5 | 0.12 | 3 | 0.51 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | triterpenoid biosynthesis | | | | | | |
| KEGG | Porphyrin metabolism | 6 | 0.33 | 7 | 0.2 | 6 | 0.27 |
| KEGG | Starch and sucrose metabolism | 13 | 0.37 | 14 | 0.68 | 13 | 0.27 |
| KEGG | Metabolic pathways | 192 | 0.35 | 244 | 0.32 | 174 | 0.48 |
| KEGG | Plant hormone signal transduction | 28 | 0.56 | 32 | 0.78 | 25 | 0.63 |

GO dayanıklılık gen ürünlerinin hücre içerisindeki yapısal durumları 8 sınıf içerisinde tanımlanmıştır (Tablo 4). Dayanıklı M3-9 ve M3-15 mutantlarındaki bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığına dayanıklılık sağlayan genler Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) veri tabanı muhtemel dayanıklılığı sağlayan 16 genin varlığını açıkça ortaya koymuştur (Tablo 4).

Çalışmalar sonunda dayanıklılıktan sorumlu 16 adet spesifik genin belirlenmesi Bakteriyel Kanser ve Solgunluk hastalık etmenin bu genler tarafından kontrol edildiğini açıkça ortaya koymaktadır. Ancak NGS analizleriyle ortaya konan 16 genden hangisinin dayanıklılıktan sorumlu olduğu hala netleşmemiştir. Ancak elde edilen genlerin bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığının kontrolündeki görev alma olasılıklarını yaygın hesaplama (common count) ile bakıldığında en yüksek değer Metabolik sinyal yolaklarında (Metabolic pathways) 174 bulunurken ikinci en yüksek değer Sekonder metobolitlerin biyosentezinde (Biosynthesis of secondery metabolites) 116 olarak bulunmuştur. (Tablo 4). Bu yüksek değerler gerek sekonder metabolitlerin gerekse metabolik sinyal yolakların dayanıklılık geni altında çalıştığının en net göstergesidir. Çalışmada bulunan en yüksek ikinci gruptaki yaygın hesaplamadaki sonuçlar Bitki hormonları ile sinyal uyumunun eşgüdümlü (Plant hormone signal transduction) çalıştığını gösteren 25 değeridir. Hemen bunu takip eden 22 değeriyle Bitki-Patojen ilişkilerinin net olarak varlığını (Plant-pathogen interaction) görülmektedir (Tablo 2). NGS analizlerinde elde edilen üçüncü gruptaki yaygın hesaplama değerlerinde ilk sırada RNA nin bozulmasına (RNA degradation), Nişasta ve sükroz şekerlerini içeren metabolizmalar (Starch and sucrose metabolism) 13 değerleriyle gelmektedir. Hemen bunun arkasında Homolog rekombinasyonlar (Homologous recombination) 11 değeriyle yer almaktadır. Dördüncü grupta bulunan yaygın hesaplama değerlerinde ilk sıra 9 değeriyle Zeatin biyosentezinden (Zeatin biosynthesis) sorumlu gen(ler), 8 değeriyle hücre zarında çalışan organel Lizozom (Lysosome) fonksiyonunundaki değişimler gelmektedir. Son olarak 7 değeriyle sırasıyla ATP ye bağlı kromatin yeni modeliyle (ATP-dependent chromatin remodeling) oluşturulan protein yapıları, Glisin, Serin ve Treonin metabolizmalarındaki (Glycine, serine and threonine metabolism) genler ve hücre içerisindeki DNA yı tamir eden (Base excision repair) hücre içi mekanizmalar yer almaktadır. Bu grupta 6 hesaplanan değeriyle yer alan son genler sırasıyla klorofilin içinde görev yapan Porfirin metabolizmalarından (Porphyrin metabolism) sorumlu genlerle, Yağ asitlerinin biyosentezinden sorumlu (Fatty acids biosynthesis) genler gelmektedir. Son olarak en küçük hesaplanan değer olan 3 ile Sequiterponoid ve triterpenoid biyosentezinden (Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis) sorumlu genler gelmektedir (Tablo 4).

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu yaptığımız çalışmayla 16 yıldır üzerinde çalıştığımız Bakteriyel kanser ve solgunluk hastalık etmenin kontrolünü sağlayan 16 adet dayanıklılık geni bulunmuştur. Orijinal NCEBR3 domates bitkisi ve bu bitkinin EMS mutasyonuyla elde edilen Bakteriyel kanser ve solgunluk etmenine dayanıklı bulunan M3-9 ve M3-15 bitkileri İleri Nesil Sekanslama (Next Generation Sequencing) sistemiyle analizleri dayanıklılıktan sorumlu olan genleri ortaya koymuştur.

Sesquiterpenoidler (C15 terpenoids) terpenoidler gruplarını içeren kimyasallar olup yapılarında 3 isoprene ünitesi bulunmaktadır. Bu sesqueterpenoidler ve triterpenoidler farnesil difosfat (FPP) yapılarından oluşmakta çok sayıda ana yapının içerisinde üretilmektedir.

Bitkilerde çok sayıda sesquiterpenoid ve terpenoid yapıları üretilmekte olup dayanıklılık mekanizmalarından görev aldığı yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Li et al., 2025).

Elde edilen tüm sonuçlar literatür bilgileri ile örtüşmekte olup mutant M3-9 ve M3-15 bitkileri ile Bakteriyel kanser ve solgunluk etmeni arasında konukçu-patojen ilişkisinin varlığını (plant-pathogen interaction), patojen bakteriyel etmenin tanılanmasından sonra sahip olduğu sinyal yolaklarının kullanarak (meatbolic pathways) kontrol ettiği sekonder metabolitlerin üretiminden (biosyntehesis of secondary metabolites) bitkinin hormon sinyalizasyonunu (plant hormone signal trasndustion) aktive etmektedir. Sinyal yolaklarının üzerinde bulunan yağ asidi biyosentezlerini, RNA degradasyonu (RNA degradation), DNA tamir mekanizmaları ve bunların sonucunda oluşan Glisin, Serin ve Tireonin amino asitlerinden oluşan protein yapısını kullandığı anlaşılmaktadır. Özellikle bitki hücresinin zarı üzerinde yer alan lizozom ve zeatin oluşumlarıyla hücre içerisindeki kimyasal yapıları güçlendirdiği düşünülmektedir. Bu güçlendirmeler sonucunda belki de hücre içerisine ve hücreler arası boşlukta yaşayan hastalık etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* etmeninin ihtiyaç duyduğu nişasta ve sükroz gibi metabolitlerin (starch and sucrose metabolism) taşınımı engellenmiş, klorofillerdeki porfirin metabolizması sonucunda elde edilen kimyasallar bakterinin gelişimini kısıtlamıştır. Dayanıklı mutantlardaki muhtemel bu dayanıklılık geni ve altındaki sinyal yolakları içerisinde meydana gelen mekanizmalar ilişkilendirilmiştir.

Proje çalışmasında Yeni Nesil Sekanslamayla 1 Terabit (Tb) üzerinde sekans verisi elde edilmiş, bu verilerin analizleriyle yukarıda belirtilen sonuçlar özetlenerek sunulmuştur. Ancak bu çok büyük veri kaynağı bile bakteriyel kanser ve solgunluk hastalık etmenini kontrol eden gen(ler)i tam olarak ortaya koymamıştır. Çalışmanın sonuçları V. Uluslararası Bitki Islahı Kongresinde (1-5 Aralık 2025) sözlü sunum yapılarak sunulacaktır. Kongreye gönderilen özet ve kabul yazısı Ekler kısmında sunulmuştur.

## 6. KAYNAKLAR


Alonge, M., Lebeigle, L., Kirsche, M., Jenike, K., Ou, S., Aganezov, S., … Soyk, S. (2022). Automated assembly scaffolding using RagTag elevates a new tomato system for high - throughput genome editing, Genome Biology, 22: 1–19.

Alonge, M., Soyk, S., Ramakrishnan, S., Wang, X., Goodwin, S., Sedlazeck, F. J., … Schatz, M. C. (2019). RaGOO: Fast and accurate reference-guided scaffolding of draft genomes. Genome Biology, 20(1), 1–17.

Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., ... & Roe, P. M. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. Nature, 456 (7218): 53-59.

Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics, 30 (15): 2114–2120.

Çalış, Ö., Bayan, Y., Çelik, D. (2012). Characterization of resistant tomato mutants to bacterial canker disease. African Journal of Biotechnology, 11(32): 8070-8075.

Çalış, Ö., Sayğı, S., Çelik, D., Bayan, Y. (2013). Domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığına dayanıklılık ve ters genetik. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 26(1):5-10.

Doyle, J. J. Doyle, J. L. (1991). Isolation of Plant DNA Fresh Tissue. Focus 12: 13-15.
Karabulut, D. (2014). Bakteriyel Kanser ve Solgunluk (Clavibacter michiganenesis subsp. michiganensis: Cmm) Hastalığına Dayanıklı Ümitvar Domates Mutantlarında Dayanıklılığın Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi fen Bilimleri Enstitüsü. Pp.82.

Hosseini, M., Pratas, D., Morgenstern, B., Pinho, A. J. (2020). Smash++: an alignment-free and memoryefficient tool to find genomic rearrangement. GigaScience, 9(5): 1–15.

Karabulut, D., Çalış Ö. (2022). Bakteriyel Kanser ve Solgunluk Hastalığına Dayanıklı Ümitvar Domates Mutantlarında PR1 Geninin Dayanıklılık Mekanizmasındaki Rolü. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, 19(1): 120-131.

Li L, Luo W, Wang Q, Wang D, Li Z, Tang R, Wang Q, Tian H, Zhao L, Niu Y, (2025). Multi-omic analysis highlights new candidate genes involved in triterpenoid and sesquiterpenoid biosynthesis in *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. Industrial Crops and Products, 226:120685.

Karakaş, H. (2016). Domates Bakteriyel Kanser ve Solgunluk Hastalığına Karşı Dayanıklı M3-15 Mutant Domates Bitkisinde Haritalama. Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi fen Bilimleri Enstitüsü. Pp.105.

Özdemir, F. (2016). Domates Bakteriyel Kanser ve Solgunluk Hastalığına Karşı Dayanıklı M3-9 Mutant Domates Bitkisinde Haritalama Çalışmaları. Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi fen Bilimleri Enstitüsü. Pp.85.

Pavlidis, P., Živković, D., Stamatakis, A., Alachiotis, N. (2013). SweeD: Likelihood-Based Detection of Selective Sweeps in Thousands of Genomes. Molecular Biology and Evolution, 30(9): 2224–2234.

Yu, J., Pressoir, G., Briggs, W. H., Vroh Bi, I., Yamasaki, M., Doebley, J. F., ... Buckler, E. S. (2006). A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. Nature Genetics, 38(2): 203-208.

## 7. EKLER

### Identification of Candidate Genes Related to Resistance of Bacterial Canker and Wilting Disease

Bacterial canker of tomato, caused by the Gram-positive bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), represents one of the most devastating diseases affecting global tomato production. This seed-borne pathogen has caused catastrophic epidemics in major tomato-growing regions worldwide. A prominent control is Cmm-resistant cultivars for tomato production is a suitable way for sustainable and eco-friendly method. For genetic control of the Cmm, a chemical mutagenized susceptible EBR3 tomato lines generated resistant M3-9 and M3-15 plants. Aims of the study are to identify resistance gene(s) controlling Cmm pathogen, to understand resistant gene(s) mediated mechanisms and to examine differences in gene expression between resistant mutants and susceptible original EBR3 plants. High-throughput sequencing was performed on an Illumina HiSeq platform for these three genotypes. After the filtering process, each individual FASTQ file was aligned to the *Solanum lycopersicum* reference genome "SLM_r2.1" with using Bowtie2 software. They were properly mapped with the values of >99.8 for all genotypes. Genotype specific individual binary sequence alignment file format (BAM) files were subjected to variant calling using freebayes. All variants from these genotypes were merged. Potential gene regions were monitored with the use Integrated Genome Browser and compared with disease scores obtained from EBR3, M3-9, and M3-15 plants. A total of 17 potential regions related to resistance to canker and wilting disease were identified.

**Keywords:** Tomato, Resistance, Bacterial canker and wilting




**Subject:** Acceptance for Oral Presentation – 5th International Plant Breeding Congress (1–5 December 2025)

**Dear Özer Çalış,**
**Akdeniz University Faculty of Agriculture Plant Protection Department, The Campus 07059 Konyaalti-Antalya/TURKIYE**
**Département de Phytologie, Université Laval, Québec City, Québec, CANADA 3Agriculture and Rural Development Support Institution, Muş/TURKIYE**

On behalf of the Organizing Committee of the 5th International Plant Breeding Congress (INTPBC 2025), to be held on 1–5 December 2025, we are pleased to inform you that your submission titled **"Identification of Candidate Genes Related to Resistance of Bacterial Canker and Wilting Disease" [Submission ID:0012]** has been accepted for an **Oral Presentation.**

Your paper was evaluated through a double blind peer review by the Scientific Committee using a standardized scoring rubric. We appreciate your valuable contribution to the congress program.

**Presentation scheduling**

- The venue, session, date, and time of your talk will be communicated in the final program.
- Please plan for a **[12–15] minute presentation followed by [3–5] minutes of Q&A.**
- Presentation format: PPTX or PDF, 16:9 aspect ratio, in English.
- Please check in at the Speakers' Ready Room and upload your slides at least 60 minutes before your session.

**Full paper for the digital proceedings**

- If you wish your work to appear as a full paper in the digital proceedings, please upload the full paper by **15 November 2025** via the submission portal below. Otherwise, only your abstract (as originally submitted) will be included.
- Upload portal: https://www.abstractagent.com/2025intpbc/ (log in with your AbstractAgent account)
- **Steps to upload:**

1. Please keep your full text file ready (as a Word or PowerPoint format) during the submission process.
2. Please login to AbstractAgent ..... with your email and password during abstract submission.
3. Click "My Abstracts".
4. Click blue "Upload Your Fulltext" button. You can upload your Full Text file (in doc, .docx, .ppt, .pptx, .pps, .odt format)."

**Journal publication opportunity (EKIN)**

- **Oral presentations, following peer review, will be published in EKIN, Journal of Crop Breeding and Genetics (subject to the journal's editorial processes and timelines).**
- Where appropriate, a Special Issue dedicated to INTPBC 2025 may be arranged. Further details (author guidelines, timelines, submission route) will be announced.

**Registration**

- At least one author must complete congress registration by **1 November 2025** for the paper to be included in the final program and proceedings.

**Speaker biography**

- Please e mail a short biography (80–120 words) to intpbc2025@figur.net by **1 November 2025** for use by session chairs and in program materials.

**Policies and support**

- By submitting the full paper, you confirm compliance with ethical standards and originality.
- Requests for visa invitation letters and any questions (scientific or technical) can be directed to: intpbc2025@figur.net
- Details on templates, formatting, and proceedings (e.g., ISBN/DOI) will be provided on the congress website and via email updates.

We look forward to welcoming you to a productive and inspiring congress.

**Best regards,**

Prof. Dr. S. Ahmet Bağcı
Chair, Organizing Committee
5th International Plant Breeding Congress (INTPBC 2025)
Email: intpbc2025@figur.net

**Organization Secretariat**
FİGÜR KONGRE & ORGANİZASYON
19 Mayıs Mah. 19 Mayıs Cad. Nova Baran Center No: 4
34360 Şişli - İstanbul / TÜRKİYE
**Phone**: +90 212 381 46 00 **Fax**: +90 212 258 60 78 **E-mail**: intpbc2025@figur.net

**www.intpbc.org**