

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**BİBER HAFİF BENEK VİRÜS'ÜNE (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) KARŞI
L4 DAYANIKLILIK DURUMUNUN TARANMASI ve MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE KARAKTERİZASYONU**

Murat BARUT

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MAYIS 2019

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**BİBER HAFİF BENEK VİRÜS'ÜNE (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) KARŞI
L4 DAYANIKLILIK DURUMUNUN TARANMASI ve MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE KARAKTERİZASYONU**

Murat BARUT

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MAYIS 2019

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİBER HAFİF BENEK VİRÜS'ÜNE (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) KARŞI
L4 DAYANIKLILIK DURUMUNUN TARANMASI ve MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE KARAKTERİZASYONU**

Murat BARUT

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FYL-2018-3638 nolu proje ile desteklenmiştir.**

MAYIS 2019

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİBER HAFİF BENEK VİRÜS'ÜNE (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) KARŞI
L4 DAYANIKLILIK DURUMUNUN TARANMASI ve MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE KARAKTERİZASYONU

Murat BARUT
BİTKİ KORUMA
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 28.05.2019 tarihinde jüri tarafından kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Hakan FİDAN

Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

Dr. Öğr. Üyesi Gökmen KOÇ

ÖZET

BİBER HAFİF BENEK VİRÜS'ÜNE (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) KARŞI L4 DAYANIKLILIK DURUMUNUN TARANMASI ve MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE KARAKTERİZASYONU

Murat BARUT

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hakan FİDAN

Mayıs 2019; 54 sayfa

Biber hafif benek virüsü (*Pepper mild mottle virus*- PMMoV) Tobamovirüsler içerisinde yer alan dünya genelinde biber üretim alanlarında en sık karşılaşılan virüslerden biridir. Bu virüs çoğu zaman hasat dönemine kadar gizli kalabilmekte ve en büyük zararlarını hasat döneminde meyveler üzerinde meydana getirebilmektedir. Bölgemizde son yıllarda biber üretim alanlarında sıklıkla karşılaşılan bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. L4 geni vasıtasıyla sağlanan dayanıklılığın, dünyanın farklı bölgelerinde dayanıklılığı kıran izolatın rapor edilmesiyle, ülkemizde de bu hastalığın epidemik durumunun araştırılması gerekliliğini ortaya koymuştur. L4 dayanıklılığının etkinliğini belirleyebilmek için bölgemizden biber üretim alanlarında PMMoV ile şüpheli örnekler toplanmıştır. RT-PCR tekniği ile doğrulanan bu örnek PMMoV-Kum olarak kodlanmıştır. ve Gen bankasına kaydı yapılarak erişim numarası (MK806437) alınmıştır. PMMoV-Kum izolatı 1 hassas (B1) ve 5 dayanıklı (L4B1,L4B2,L4B3,L4B4,L4B5) bitkilerine mekanik inokulasyon yöntemi ile bulaştırılmıştır. Yapılan fenotipik gözlemler neticesinde PMMoV-Kum izolatının L4 genine bağlı dayanıklılığın üstesinden gelmediği biyolojik testler ile doğrulanmıştır. Dayanıklı olarak seçilen bitkiler üzerinde herhangi bir PMMoV semptomunun oluşmaması üzerine en başarılı çalışan L4 markırlarını belirlemeye yönelik primerlerin belirlenmesi tez çalışmasının seyrini belirlemiş ve en başarılı markırın AP-7/AP-8 ve P118/119 primer çiftleri olduğu tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: L4 geni, Dayanıklılığın kırılması, Biber, Biber hafif benek virüsü, PMMoV

JÜRİ: Dr. Öğr. Üyesi Hakan FİDAN

Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

Dr. Öğr. Üyesi Gökmen KOÇ

ABSTRACT

SCREENING THE L4 RESISTANCE STATUS OF PEPPER MILD MOTTLE VIRUS (PMMoV) AND ITS CHARACTERIZATION WITH MOLECULAR METHODS

Murat BARUT

MSc Thesis in Plant Protection

Supervisor: Dr. Hakan FIDAN

May 2019; 54 pages

Pepper mild mottle virus (PMMoV) is one of the most common viruses found in *Tobamoviruses* worldwide. This virus, which has the potential to cause economic losses, can be kept secret until the time of the harvest and it can cause the biggest damages on pepper fruits in this period. During the 2016-2019 production period in our region, it has been a problem that is frequently seen in pepper areas. To report the isolation of isolate from different regions of the world in terms of the resistance obtained by the *L4* gene which is preferred in the fight against this disease, the necessity to investigate its share in the increase in the incidence of this disease in our country. In order to determine the effectiveness of *L4* resistance, PMMoV and suspicious samples were collected from our region in pepper production areas. This sample, which was confirmed by RT-PCR technique, coded PMMoV-Kum and the gene bank was registered and the access number (MK806437) was obtained. PMMoV-Kum isolate 1 is transmitted to the sensitive (B1) and 5 resistant (L4B1, L4B2, L4B3, L4B4, L4B5) plants by mechanical inoculation. As a result of the phenotypic observations, PMMoV-Kum and isolate was confirmed by biological tests that it did not overcome the resistance due to *L4* gene. The determination of primers to determine the most successful *L4* markers upon the non-occurrence of any PMMoV symptoms on the selected plants was determined as the most successful AP-7 / AP-8 primer. After determining that PMMoV isolate was not an isolator that breaks the *L4* strength, phylogenetic analyzes were performed to determine the location of this isolate in the world isolates. As a result of the filoegenetic analyzes.

KEYWORDS: *L4* gene, Pepper, Breaking resistance, Pepper mild mottle virus (PMMoV), Mechanical inoculation, RT-PCR

COMMITTEE: Asst. Prof. Hakan FIDAN

Assoc. Prof. Dr. Özer ÇALIŞ

Asst. Prof. Gökmen KOÇ

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, ülkemizde en çok tüketilen sebzelerin başında gelen biberin, en önemli virüs hastalıklarından, Biber Hafif Benek Virüs'ü (PMMoV) hakkında araştırma yapılmıştır. Sebze virüs hastalıklarıyla en etkin mücadele yöntemlerinin başında dayanıklı çeşit seçimi gelmektedir. Dayanıklı çeşitlerin kullanılması ise üreticiye ek bir maliyet getirisinin olmayışı ve çevreye zararsız olması nedeniyle en önemli konuyu oluşturmaktadır. Bölgemizdeki birçok firma klasik ıslah yöntemleri ile dayanıklılık ticari çeşitler elde etmeye çalışmaktadır. Projemizde elde edilen bilgiler; PMMoV dayanıklı bitkiler elde etmek için klasik ve moleküler ıslah yöntemlerinin bir arada kullanılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu çalışma, dayanıklı biber çeşitleri elde etmek isteyen araştırmacılara yol gösterecek, dayanıklı çeşit ve adaylarını hızlı bir şekilde piyasaya sunma aşamasına geçmesini hızlandıracaktır.

Tez çalışmamda planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Hakan FİDAN'a teşekkürlerimi sunarım. Bu zorlu tez sürecinde benden desteğini bir an için bile esirgemeyen değerli arkadaşlarım; Nuray Sarı ve Pelin Sarıkaya'ya, tüm eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen her zaman yanımda olan sevgili aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
AKADEMİK BEYAN.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Biber Hakkında Genel bilgiler ve Tarihçesi.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	4
2.1. Biber Hakkında Genel Bilgiler.....	4
2.2. PMMoV Hakkında Genel Bilgiler.....	5
2.3. Taşınımı, Simptomları ve Konukçuları.....	7
2.4. PMMoV'in Dünya Üzerindeki Yayılımı.....	9
2.5. PMMoV Dünyada ve Türkiye'deki Durumu ve Bu Hastalık İçin Kullanılan.....	
Dayanıklılık Kaynakları.....	10
2.6. <i>L4</i> ve <i>L3</i> Geninin Belirlenmesi İçin Kullanılan Markırlar.....	13
3. MATERYAL VE METOT.....	16
3.1. Materyal.....	16
3.2. Metot.....	19
3.2.1. PMMoV'nin <i>L4</i> geni vasıtasıyla sağladığı dayanıklılık durumunun.....	
belirlenmesi.....	19
3.2.2. Test bitkilerinin <i>L4</i> dayanıklılıklarının belirlenmesi.....	20
3.2.3. Test bitkileri üzerinde PMMoV'nin moleküler yöntemler kullanılarak.....	
belirlenmesi.....	21
4. BULGULAR.....	25
4.1. PMMoV İzolatının Elde Edilmesi, Test Bitkilerine İnokulasyonu.....	25
4.2. <i>L4</i> Geninin Varlığını Moleküler Markırlar Kullanılarak Belirlenmesi.....	29
4.3. Bitkilerin Mekanik İnokulasyon Sonrası Gözlenen Simptomlar.....	29
4.4. PMMoV-Kumluca İzolatına Ait Filogenetik Analizler.....	33
5. TARTIŞMA.....	39

6. SONUÇLAR.....	44
7. KAYNAKLAR.....	46
8. EKLER.....	54
ÖZGEÇMİŞ	



AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “Biber Hafif Benek Virüs’üne (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) Karşı L4 Dayanıklılık Durumunun Taranması ve Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyonu” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, yapılan tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

28/05/2019

Murat BARUT

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	: Santigrat Derece
%	: Yüzde
%w/w	: Ağırlıkça yüzde
µl	: Mikro litre
ml	: Mili litre

Kisaltmalar

AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılmış Parça Uzunluğu) Polimorfizmi
AMV	: <i>Alfalfa mosaic virüs</i>
Arg	: Arginine
AÜ	: Akdeniz Üniversitesi
BAC	: Bacterial artificial chromosomes
Bp	: Baz çifti
BBWV	: <i>Broad bean wilt virüs</i>
BPeMV	: <i>Bell pepper mottle virüs</i>
BSA	: Bulk segregant analysis
ChiVMV	: <i>Chilli veinal mottle virus</i> -Şili Damar Benek Virüsü
CMV	: <i>Cucumber mosaic virus</i> - Hıyar Mozaik Virüsü
DAS-ELISA	: Double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay
ddH ₂ O	: Çift distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
E.C	: Electrical Conductivity (Elektiriksel İletkenlik)
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit

EMDV	: <i>Eggplant mottled dwarf virus</i>
EPPO	: Avrupa ve Akdeniz Bitki Sağlığını Koruma Örgütü
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
Gln	: Glutamine
Gly	: Glycine
HR	: Hipersensitif (aşırı hassasiyet) Reaksiyonu
HR	: High Resistance-Yüksek dayanım
IR	: Intermediate Resistance-Kısmi dayanım
Lt	: <i>Leveillula taurica</i> -Biberde külleme hastalığı
Lys	: Lysine
M	: Molar
Ma	: <i>Meloidogyne arenaria</i> -Kök ur nematodu
Mi	: <i>Meloidogyne incognita</i> -Kök ur nematodu
Mj	: <i>Meloidogyne javanica</i> -Kök ur nematodu
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
nm	: nano metre
nt	: Nükleotid
ObPV	: <i>Obuda pepper virus</i>
ORF	: Open Reading Frame (Okuma çerçevesi)
PaMMV	: <i>Paprika mild mottle virus</i>
PCR	: Polymerase Chain Reaction
pH	: Power of Hydrogen(Bir çözeltinin asit baz dengesi)
PMMoV	: <i>Pepper mild mottle virus</i>
PVY	: <i>Patato virus Y</i>
PVX	: <i>Patato X virüs</i>
RAPD	: Rastgele Çoğaltılmış Polimofik DNA

RB	: Resistance Breaking-Dayanıklılığı Kıran
RdRp	: RNA-dependent RNA polymerase
RNA	: Ribonükleik asit
Rpm	: Rounds per minute (Devir/dakika)
RT-PCR	: Reverse transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu
SCAR	: Sequence Characterized Amplified Region
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
Sp.	: Species (Türler)‘in Kısaltması
TAE	: (Tris-Acetate-EDTA) Elektroforez buffer
TMV	: <i>Tobacco mosaic virus</i> -Tütün Mozaik Virüsü
TMGMV	: <i>Tabacco mild green mosaic virüs</i>
ToCV	: <i>Tomato clorosis virüs</i> -Domates Kloroz Virüsü
ToMV	: <i>Tomato mosaic virus</i> -Domates Mozaik Virüsü
tRNA	: Taşıyıcı Ribonükleik Asit
TSWV	: <i>Tomato spotted wilt virüs</i> -Domates Lekeli Solgunluk Virüsü
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
TYLCV:	: <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> –Domates sarı yaprak kıvrıcıklığı Virüsü
UTR	: Untranslated region
UV	: Ultra Viole
V	: Volt
vd	: Ve diğerleri
w/w	: Hacimde ağırlıkça yüzde

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. İlçe bazında biber üretimi.....	1
Şekil 1.2. Biber üretim alanlarında verimi sınırlandıran virüs hastalıkları.....	2
Şekil 2.1. Bazı biber çeşitlerinin meyveleri, a) <i>Capsicum frutescens</i> , b) <i>C. chinense</i>	4
Şekil 2.2. <i>C. chacoense</i> ait görsel.....	5
Şekil 2.3. PMMoV ait genomik bilgiler (Anonim-Viral Zone).....	6
Şekil 2.4. TSWV ve PMMoV'nin bitkiler üzerinde meydana getirdiği belirtiler.....	8
Şekil 2.5. PMMoV'nun biber yaprağı ve meyvesi üzerindeki belirtileri.....	9
Şekil 2.6. PMMoV'nin dünya genelindeki dağılımı.....	10
Şekil 3.1. Bitkilere mekanik inokulasyon aşaması.....	19
Şekil 3.2. Mekanik inokulasyon sonrasında bitkilerde meydana gelen belirtiler.....	19
Şekil 3.3. PMMoV izolatının mekanik inokulasyon uygulanması.....	21
Şekil 3.4. PMMoV-Kum izolatının çoğaltılan alanı.....	23
Şekil 4.1. 23.09.18-01.12.18 tarihleri arasında kurulan denemeye ait görüntüler.....	27
Şekil 4.2. 10.01.18-25.03.18 tarihleri arasında kurulan denemeye ait görüntüler.....	27
Şekil 4.3. 01.04.18-27.07.18 tarihleri arasında kurulan denemeye ait görüntüler.....	28
Şekil 4.4. 01.07.18-25.10.18 tarihleri arasında kurulan denemeye ait görüntüler.....	28
Şekil 4.5. 02.11.19-30.03.19 tarihleri arasında kurulan denemeye ait görüntüler.....	28
Şekil 4.6. B1 bitkisinde meydana gelen belirtiler.....	29
Şekil 4.7. L4B2, L4B3, L4B4, L4B5, L4B6 15-20 gün sonraki durumları.....	30
Şekil 4.8. Tüm test bitkilerine ait RT-PCR analizine ait jel görüntüleri;.....	31
Şekil 4.9. L4 primerlerine ait jel görüntüleri.....	32
Şekil 4.10. PMMoV'nin dahil olduğu <i>Tobamovirus</i> lerin genom yapısı.....	33
Şekil 4.11. PMMoV-Kumluca izolatının BLAST Analiz sonuçları.....	35
Şekil 4.12. PMMoV-Kumluca izolatına ait filogenetik analizler.....	37

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Antalya’da 2018 yılına ait biber üretim bilgileri.....	1
Çizelge 2.1. <i>L</i> genleri ve sağladıkları dayanıklılık.....	11
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan bitkilerin <i>L4</i> geni bakımından durumları.....	16
Çizelge 3.2. Denemede kullanılan çeşitlere ait bilgiler.....	17
Çizelge 3.3. Denemede kullanılan insektisitler ve aktif maddeleri.....	18
Çizelge 3.4. Test bitkilerinde sulama suyunda kullanılan gübre içeriği.....	18
Çizelge 3.5. <i>L4</i> dayanımını belirlemek için kullanılan primerlere ait bilgiler.....	20
Çizelge 3.6. Moleküler analizler için kullanılan PCR bileşenleri.....	20
Çizelge 3.7. RT-PCR çalışmalarında kullanılan primer çiftleri.....	22
Çizelge 3.8. RT-PCR çalışmasında kullanılan kitin içerikleri.....	23
Çizelge 3.9. PCR çalışmasında kullanılan PCR protokolü.....	23
Çizelge 4.1. PMMoV-Kum izolatu için oluşturulan deneme planı.....	26
Çizelge 4.2. 6 biber çeşidinin 5 farklı primer kombinasyonuna ait PCR çalışması.....	31
Çizelge 4.3. PMMoV sekansına ait bilgiler.....	34
Çizelge 4.4. Filogenetik Analizler için kullanılan izolatlara ait bilgiler.....	36
Çizelge 4.5. Filogenetik analizlerde kullanılan izolatlar’a ait veriler.....	38

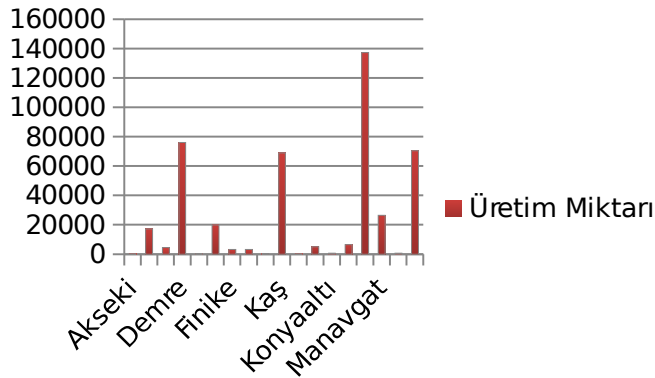
1. GİRİŞ

1.1. Biber Hakkında Genel bilgiler ve Tarihçesi

Biber (*Capsicum annuum* L.) dünyada en yaygın olarak yetiştirilen ve ekonomik olarak önemli yere sahip sebze gruplarından biridir. Solanaceae familyasının bir üyesi olan biberin anavatanı Amerika olup, Amerika kıtasında kültüre alınan ilk bitkiler arasındadır. Amerika'nın keşfinden sonra İspanya'ya getirilen bu bitkinin 30 kadar türü olduğuna dair bilgiler mevcuttur. Ancak bu türlerden *Capsicum annuum* L. dışında kalanların ekonomik anlamda sebze olarak tarımı yalnızca Amerika'nın orta ve güney bölümlerinde yapılmaktadır (Abak ve Pitrat 1981). Üretimi dünya çapında yılda yaklaşık 30 milyon tonu bulduğu bilinmektedir. Dünya genelinde yoğun olarak tarımı yapılan bu ürün bazı alanlarda “siyah altın” veya “baharatların kralı” olarak isimlendirilmektedir. FAO'nun 2017 verilerine göre dünyada 34.655.814 ton biber üretimi yapılmaktadır. Ülkemizde ise TÜİK 2018 verileri dikkate alınarak inceleme yapıldığında toplam biber üretiminde ilk sırayı 439.255 ton ile Antalya ilinin geldiği ikinci sırada 308.892 ton ile Mersin ilinin, üçüncü sırada 237.754 ton ile Bursa ilinin, dördüncü sırada 233.419 ton ile Çanakkale ilinin, beşinci sırada ise 172.355 ton ile Manisa ilinin geldiği görülmüştür. Biber ülkemizde Salçalık-Kapya, Dolmalık, Sivri ve Charleston türleri olarak üretimi gerçekleştirilmekte olup bu ürün grupları içerisinde 187.311 ton ile Sivri çeşidi en fazla üretimi yapılan biber çeşidi olarak karşımıza çıkmaktadır. Antalya bölgesinde 2018 yılında biber tiplerine ait üretim bilgileri Çizelge 1.1'de gösterilmiştir. Antalya ili ilçeler bazında üretim miktarları Şekil 1.1'de şematize edilmeye çalışılmıştır.

Çizelge 1.1. Antalya'da 2018 yılına ait biber üretim bilgileri

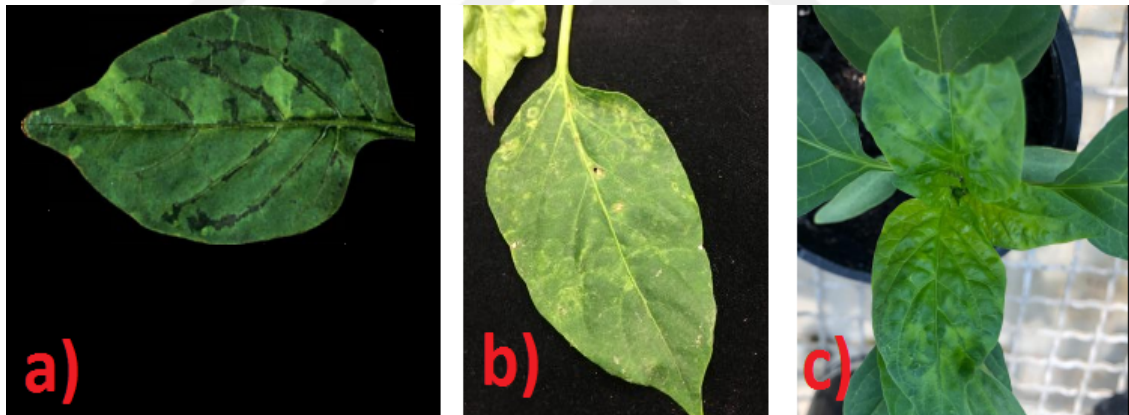
Ürün	Dekar	Ton
Salçalık, Kapya	12130	94192
Dolmalık	12989	88765
Sivri	28027	187311
Charleston	6422	68987



Şekil 1.1. İlçe bazında biber üretimi

Biber yetiştiriciliği yapılan açık alan ve seralarda üretim maliyetlerini sınırlandıran birçok faktör karşımıza çıkmaktadır. Biber yetiştiriciliği yapılan alanlarda hem kaliteyi hem de üretim miktarını etkileyen en önemli faktörlerin başında virüs hastalıkları gelmektedir (Anandakumar vd. 2008).

İster hobi bahçeciliği olsun ister büyük biber üretim alanları olsun yetiştirildikleri bölgelerde bu bitkiler birçok faktör tarafından tehdit edilmektedir. Virüs hastalıkları ile mücadelede en başarılı yönetim modeli, dayanıklı çeşitlerin ıslahı ve bu hastalıklara vektörlük yapan böcekler ile kültürel-kimyasal mücadele yöntemlerinin kullanılmasıdır. Biber üretimi yapılan alanlarda en çok rastladığımız vektörlerin başında afitler (*Myzus persica*), thripsler (*Thrips tabaci*, *Frankliniella occidentalis*) ve beyazsinekler (*Bemisia tabaci*) gelmektedir. Bu böceklerin vektörlük yaptığı hastalıklardan *Potato virus Y*, *Tomato spotted wilt virus*, *Tomato yellow leaf curl virus* vb. gibi birçok virüs hastalıklığıyla kısmende olsa mücadele söz konusudur. Bazı araştırmacılar biber üretim alanlarında sık rastlanan ve önemli olan üç virüs *Potato virus Y* (PVY), *Tomato Spotted wilt virus* (TSWV) ve *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) üzerinde durmuşlardır (Kim vd. 2008; Janzac vd. 2009; Scholthof vd. 2011). Şekil 1,2’de PVY, TSWV ve PMMoV ile enfekteli biber bitkilerine ait simptomlar gösterilmiştir.



Şekil 1.2. Biber üretim alanlarında verimi sınırlandıran virüs hastalıkları **a)** PVY, **b)** TSWV, **c)** PMMoV

Biber üretim alanları birçok virüs etmeninden olumsuz yönde etkilenmesine rağmen bu üç virüs üretimi oldukça sınırlandırmaktadır. Birçok virüs vektörü ile kimyasal-kültürel mücadeleler yapılarak hastalık kontrol altında tutulabilmektedir. Fakat daha büyük sorun ise PMMoV’inde dahil olduğu *Tobamovirus*ler gibi temas yoluyla bile rahatlıkla bulaşabilen ve şüana kadar vektörü tespit edilmeyen yada edilemeyen virüslerin varlığıdır. Virulensliği çok yüksek olan bu virüslerin mücadelesi bir o kadar zor olmaktadır.

Son zamanlarda hem üreticiler ve hem de ıslah firmaları tarafından, PMMoV ile ilgili şikayetlerin arttığı tespit edilmiştir. Yürütmüş olduğumuz bu çalışma ile de bu

farkın nedenleri ve *L4* ile sağlanan dayanımın kırılıp kırılmadığının tespit edilmesi yolu izlenmiştir. Kimyasal, fiziksel ve kültürel yöntemlerin PMMoV kontrolünde bir yere kadar başarı sağlayabildiği için, dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi en önemli kontrol stratejisi olarak kabul edilmektedir. *L3* genini taşıyan bitkiler patotip P1.2'ye dayanıklıdır, fakat P1.2.3'e karşı hassastır (Matsunaga vd. 2003). Aksine, *L4* genine sahip bitkiler her iki patojene karşıda dayanıklıdır (Matsunaga vd. 2003; Kım vd. 2008). Ülkemizde de *Tobamovirus*lere karşı dayanıklılık da *L3* ve *L4* genleri etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Yoğun biber tarımı yapılan alanlarda PMMoV ile karşılaşılması sonucunda bu gen vasıtasıyla dayanıklılığın kırılıp kırılmadığı akıllarda soru işaretleri oluşturmaktadır. Yürütmüş olduğumuz bu çalışma ile üretim alanlarında kullanılan biber çeşitleri üzerinde *L4* genlerinin varlığı moleküler markırlar yardımıyla belirlenmiştir. *L4* geni içeren bitkilerde PMMoV mekanik olarak bulaştırılmış ve *L4* dayanıklılığının kırılmadığı belirlenmiştir. *L4* geni kullanılarak yürütülen ıslah çalışmalarında araştırmacılara başarılı bir yol haritası sağlamak amacıyla rapor edilen markırlar denenmiştir. Gerçekleştirmiş olduğumuz çalışma ile hem *L4* geninden kaynaklı dayanıklılığın kırılmadığı belirlenmiş ve bu genin varlığının tespitinde, en başarılı şekilde sonuç veren moleküler markırın tespiti yapılarak araştırmacılara sunulması hedeflenmiştir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Biber Hakkında Genel Bilgiler

Biber *Solanaceae* familyasına ait tatlı, acı gibi aromatik meyvelere sahip hem baharat hem de taze olarak tüketilen aynı zamanda ilaç yapımında da kullanılabilen bir üründür. Bu cins yaklaşık 40 türü bünyesinde barındırabilmektedir. Birçok türü ağızda keskin bir tat bırakan kapsaisin içerdiği bilinmektedir. Anavatanı Orta ve Güney Amerika olarak belirtildiği hemen hemen dünyanın her bölgesinde kendisine yetiştirilme alanı bulabilen bir bitkidir (Anonymous, 2013). *Capsicum annuum* bitkileri, kullanım alanlarına göre en yaygın olarak bilinen kırmızı biber veya yenibahar olarak farklı bölgelerde isimlendirilmektedir. Lee (2019), yaptığı araştırmasında *Capsicum* türleri altı ana tür'e ayrılmaktadır. Bunlar; *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum*, *C. pubescens* ve *C. assamicum* olarak ayırmıştır. Bu tür çok çeşitli meyve uzunluğuna sahip değişik renk ve aromalarına bağlı yetiştiriciliği yapılan otsu tek yıllık bir bitkidir. *Capsicum frutescens* ve *C. chinense* küçük, keskin lezzete sahip meyveleri bulunan acı sos yapımında tercih edilebilen çeşitlerdir. Bu çeşitlere ait fotoğraflar şekil 2.1'de paylaşılmıştır.



Şekil 2.1. Bazı biber çeşitlerinin meyveleri, a) *Capsicum frutescens*, b) *C. chinense*

Biber verim ve kalitesini sınırlayan en önemli faktörlerden biri viral hastalıklardır (Milošević vd. 2014, Petrović vd. 2010, Anandakumar vd. 2008). *Tobamovirus* grubuna ait virüsler, özellikle *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV) ve *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) biber yetiştiriciliği yapılan her alanda her zaman bir tehdit unsuru olarak varlıklarını sürdürebilmektedir. Biber hafif benek virüsü (PMMoV), ticari biber üretimini etkileyen ve dünya çapında büyük ekonomik kayıplara neden olan en önemli patojenlerden biri olarak nitelendirilmektedir (Genda vd. 2007). Özellikle tohumla taşınabilen *Tobamovirus*ler özellikle Cucurbitacea (Liu vd. 2014) ve Biber (*Capsicum annuum*) (Kumar vd. 2011) yetiştirilen alanlarda ciddi ekonomik kayıplara neden olabilmektedir. Bu virüsten korunmanın en etkili yolu dayanıklılık geni ihtiva ettiği bilinen çeşitlerin kullanılmasından geçmektedir. PMMoV'nin tohumla taşınması ve *Capsicum* türleri için uluslararası tohum ticaret

hacminin büyük olması bu virüsün dünya genelinde hızlı yayılmasını açıklayan nedenlerden biridir (Lamb vd. 2001).

*Tobamovirus*lere karşı dayanıklılıkta kullanılan L lokusu *Capsicum* türlerinin yabani ve kültür formlarında *Capsicum annuum* (L1), *Capsicum frutescens* (L2), *Capsicum chinense* (L3) ve *Capsicum chacoense* (L4) bulunmuştur (Berzal-Herranz vd. 1995; Boukema 1980; de la Cruz vd. 1997). L genlerinin *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Paprika mild mottle virus* (PaMMV) ve *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) olarak bilinen birkaç *Tobamovirus*e karşı dayanıklılık sağladığı bilinmektedir (Csillery vd. 1983; Pernezny vd. 2003; Wetter vd. 1984). *C. chacoense* bu türlerden en önemlilerindendir ve L4 geninin kaynağı olarak bilinmektedir. Ayrıca L4 geni; ToMV, TMV ve PMMoV'in P1, P1,2 ve P1,2,3 patotipine karşı dayanıklılık sağladığı belirtilmiştir. *C. chacoense*'ye ait görüntü Şekil 2.2'de paylaşılmıştır.



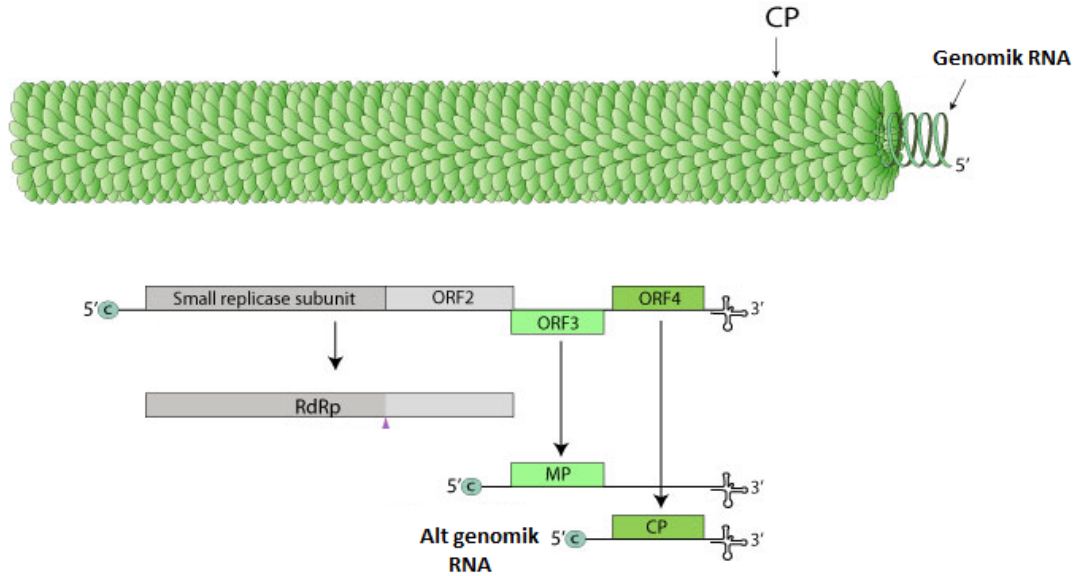
Şekil 2.2. *C. chacoense* ait görsel a) meyvesi kızarmış ve çiçeğine ait görüntü, b) çiçeğinin daha yakından bir görüntüsü, c) meyvesi yeşil dönemdeyken elde edilmiş görüntüsü

2.2. PMMoV Hakkında Genel Bilgiler

Pepper mild mottle virus (PMMoV) ilk kez ABD'de Güney Carolina'da rapor edilmiştir (McKinney, 1952). Özellikle bitkilerin, genç dönemlerinde enfekte olduğunda hafif, genel kloroz belirtileri ve bitkilerde bodurluk belirtileri meydana gelir. Meyveler küçük, malformasyon belirtileri gözlemlenir. Nekrozlar ve meyve üzerinde benekli lekeler oluşabilir. Bu belirtiler yüzünden meyveler pazar değerlerini kaybetmektedir. PMMoV, 1952 yılında ilk defa rapor edilmesinden sonra dünyanın birçok bölgesinde Arjantin, Avustralya, Kanada, Danimarka, Fransa, Macaristan, İzlanda, İtalya, Japonya, Kore, Hollanda, İspanya, İngiltere'de varlığı rapor edilmiştir. Hastalığın kontrolü için en iyi yöntem dayanıklı çeşitlerin kullanılmasından geçmektedir. Dünyanın farklı bölgelerinde L4 allelleri tarafından sağlanan dayanıklılığın üstesinden gelen yeni suşların varlığı eş zamanlı olarak rapor edilmiştir (Antignus vd. 2008).

Biber hafif leke virüsü (PMMoV), *Virgaviridae* familyasının *Tobamovirus* (Adams vd. 2009) cinsine aittir ve 6,356 nükleotidli (nt) pozitif-sens tek iplikli RNA'ya sahiptir. PMMoV, dört proteini kodlayan 6,356 nükleotidden oluşan pozitif sense

genomik RNA'sı olan *Tobamovirus*lerin içerisinde yer almaktadır: PMMoV'nin viral genomu dört açık okuma bölgesi- ORF (Open Reading Frame)'den meydana gelmektedir ve dört açık okuma bölgesinde dört farklı proteini kodlamaktadır (Fauquet, 2005). Virüs 312 nm uzunlukta ve 18 nm genişliktedir (King vd. 2012). PMMoV'a genomik bilgiler şekil 2.3'de şematize edilmeye çalışılmıştır Birinci ORF 70.nükleotidden başlayıp 3423. nükleotidde son bulmakta yaklaşık olarak 1117 amino asidi kodlamaktadır ve bu kodlanan proteine 126 K protein adı verilmiştir. 125 K proteinin sonunda yer alan amber stop kodonu (UAG) sayesinde 4908. nükleotidden başlayarak doğru okuma ile 183 K protein kodlar bu alan 1612 aminoasit proteinini kodlanmasından sorumlu olan bölgedir.Üçüncü ORF alanı 4909. nükleotidden başlayarak 5682. nükleotidde son bularak 257 amino asiti kodlar ve 30 K- Hareket proteini olarak isimlendirilir. Son ORF'de 5685. nükleottiden başlayarak 6158. nükleotidde son bularak 156 aminoasidi kodlayan Kılıf proteinini oluşturmaktadır (Alonso vd. 1991).



Şekil 2.3. PMMoV ait genomik bilgiler (Anonim-Viral Zone)

30 K proteini veya hareket proteini olarak adlandırılan alan *Tobamovirus*ler plasmodesmata kanalları yoluyla hücreden hücreye hareketi için gerekli olan alandır (Deom vd. 1987; Meshi vd. 1987). 5' ucunda bir CAP yapısı bulunmaktadır ve 3' ucundada kodlanmayan bölge olarak tRNA yapısına sahiptir. Genomik RNA, 126 ve 183 kDa replikaz proteinleri için şablondur. 30kDa protein ve CP'yi kodlayan diğer iki ORF, subgenomik RNA'lar tarafından translasyona uğratılır (Wolf vd. 1989). Viral RNA'nın plazmodesmata boyunca hareketi hareket proteini ile aralarında nükleik asid bağlanma alanlarının yardımı ile gerçekleşmektedir (Wolf vd. 1989; Oparka vd. 1997).

Kılıf proteini *Tobamovirus*ler için tek yapısal proteindir ve viral partiküllerin uzak mesafelere taşınması için gerekli bir yapıdadır (Holt ve Beachy 1991; Simon Buela

ve Garcia-Arenal 1999; Tena vd. 2012). Kılıf proteini sayesinde viral partiküller enkapside olur ve böylelikle uzak mesafelere taşınabilme imkanları bulabilmektedir (Nelson ve van Bel 1998).

2.3. Taşınımı, Simptomları ve Konukçuları

PMMoV, TMV ve ToMV gibi virüslerin dahil olduğu *Tobamogrup* virüsleri içerisinde yer almaktadır ve bu grubun üyelerinin en belirgin özellikleri bir bitkiden diğer bitkiye aktarımlarının oldukça kolay olmasıdır. *Tobamogrup* virüslere, taşıyıcılık yapan herhangi bir vektör bilinmemektedir, ancak genç bitkilere özellikle de rutin olarak el temasıyla mekanik olarak kolayca bulaşmaktadır (Ozaslan vd. 2006). PMMoV, biber yetiştiriciliği yapılan alanlarda en sık rastlanan virüslerden biri haline gelmiştir. *Tobamovirus*ler, bitkilere tohum yoluyla aktarılabildiği (Ikegashira vd. 2004; Kım vd. 2008) gibi eğer toprakta bulaşık durumdaysa (Pares ve Gunn 1989) toprak yoluyla da enfeksiyonlara neden olabilmektedir. *Tobamovirus*lerin çoğunluğu embriyo veya endospermi enfekte etmemekle birlikte, viral partiküller dış kabukta kalır ve çimlenme işlemi sırasında bitkilere bulaşabildiği birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Chitra vd. 1999; Genda vd. 2011; Sevik ve Köse-Tohumcu 2011; Liu vd. 2014). Bu virüsün mekanik olarak taşınımı oldukça önem arz eden bir konudur. Yapılan araştırmalarda *Tobamovirus* 'lerin el, tarım alet ve ekipmanları (Matsunaga vd. 2003) bunun yanı sıra sulama suyu (Choi vd. 2004) ile çok rahatlıkla taşınabildiğine ait raporlar mevcuttur. Bitkiler bir kez enfekte olduktan sonra üretim yapılan alanlarda bu virüs ile savaşmak oldukça zordur. Bu virüsün toprakta da uzun süre kalabiliyor olması, toprak dezenfeksiyonu eğer uygun koşullarda gerçekleşmezse üretim alanları için daha büyük sorunlara yol açabileceği anlamına gelmektedir. Özellikle erken dönemlerde meydana gelen enfeksiyonlar bitkilerde ölümlere bile neden olabilmektedir (Agrios 2005).

Kolay taşınabilmesinin yanı sıra yapılan araştırmalarda PMMoV'nin *Solanaceae*'nin altı cinsinden en az 24 türüne ve *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Labiatae* ve *Plantaginaceae* familyalarının bazı türlerine aktarılabildiği rapor edilmiştir (Wetter vd. 1984; Avgelis 1986). *Capsicum* türlerinin birçoğunda bu hastalık görülmesine rağmen aynı familyaya ait olan domates, patlıcan ve tütünde bu hastalık gözlenmemiştir (Milosevic vd. 2015).

Kwon vd. (2015) Kore'de biber yetiştiriciliği yapılan tarlalarda biberler üzerinde PMMoV'ye ait simptomları gösteren bitkileri belirlemişlerdir. Araştırmacılar üretim alanlarına yakın bir konumda bulunan *Rorippa palustris* üzerinde de benzer simptomlara rastlamışlardır. Bunun üzerine bu bitkiden de RNA izolasyonu yaparak hem PMMoV ait olduğu belirlenmiştir hem de tüm nükleotid dizilimi elde etme yoluna gidilerek bu izolatu PMMoV'nin P2 patotipine ait olduğunu belirlemişlerdir. *Rorippa palustris* kılıf proteinine ait olan tüm nükleotid diziliminin PMMoV'nin P2 patotipine ait olması *Rorippa palustris* üzerinde kışı geçirdiğini ve yetiştirme dönemlerinde virüsün epidemi yapmasına yardımcı olduğunu belirtmişlerdir.

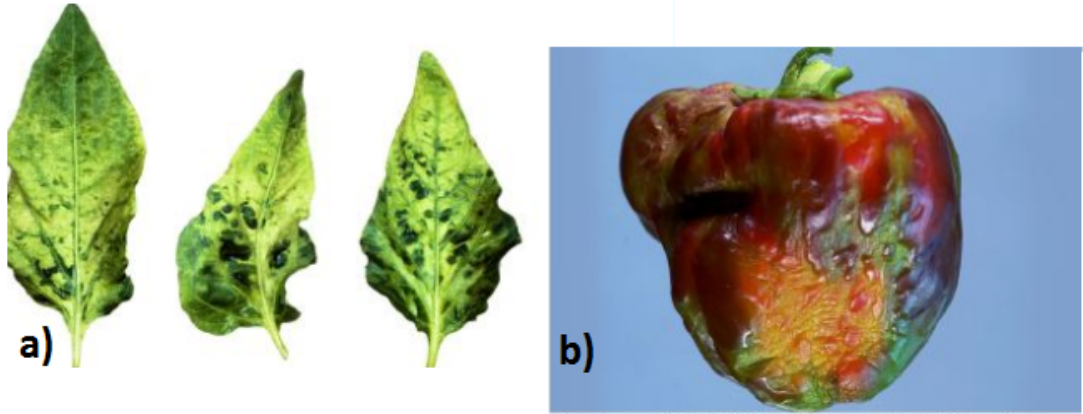
Üretim alanlarında PMMoV'nin, diğer virüs hastalıkları ile karıştırılabilme imkanı vardır. Özellikle TSWV ile simptomları kolaylıkla karıştırılabilmektedir. Şekil 2.4.'de TSWV ve PMMoV'nin biber meyveleri üzerindeki simptomları gösterilmiştir. Simptomlar, bitkiler yaşlandıkça değil de gençken enfekte olduğunda çok daha belirgindir. Bu hastalık, yapraklar üzerindeki hafif simptomları nedeniyle geç farkedilir ve birçok kez bu patojen, meyvede daha belirgin simptomlar ortaya çıkana kadar tespit edilemez. PMMoV'nin hem yapraklarda mozaik simptomlara sebep olması hem de meyvede deformasyona sebep olması bitkilerin üzerinde ekonomik verimini ciddi şekilde azaltan bir etmen olarak karşımıza çıkmaktadır (Han vd. 2017; Peng vd. 2015).



Şekil 2.4. TSWV ve PMMoV'nin bitkiler üzerinde meydana getirdiği simptomlar

PMMoV'nin neden olduğu simptomlar, özellikle bitkiler gençken enfekte olduğunda hafif kloroz ve bodurluğu içerir, ancak simptomlar biber türüne bağlı olarak değişebilir (Velasco vd. 2002).

Simptomları incelendiğinde kloroz, yaprak kıvrıcılığı, cücelik gibi belirtiler yapraklarda, (Şekil 2.5a) beneklenmeler ise meyveler (Şekil 2.5b) üzerinde görülebilmektedir. Bazı durumlarda nekrotik alanlar yaprak ve meyve üzerinde gelişmektedir. Simptomları kolaylıkla anlaşılabilmektedir. Bu simptomlar erken dönemde veya geç dönemde görülebilmektedir (Baker vd. 2000; Tena vd. 2012). Enfekteli bitkilerde bodur büyüme, yapraklar üstünde kıvrılmalar, beneklenmeler, meyveler üzerinde küçük beneklenmeler ve deforme alanlar olarak gözlemlenir (Güldür ve Çağlar, 2006). Meyveler küçük kalabilir ve meyve kabuğu üzerinde çukur alanlar gözlemlenebilir (Petrov 2014). Bitki erken dönemde enfekte olursa hastalık derecesi daha şiddetli olmaktadır. Hastalık belirtileri, mahsullerin hasat edilmesinden hemen önce meyve verme safhasında belirginleştiği için yüksek verim kayıpları söz konusudur. Bitkilere erken aşamada yapılan virolojik testler, üreticilerin zararını sınırlayacaktır (Petrov 2014). Bununla birlikte bitkiler üzerinde meydana gelen simptomlar bitkiden bitkiye de değişebilmektedir. Biber bitkilerinde virüs enfeksiyonu belirtileri genellikle enfeksiyondan 1-3 hafta sonra gelişir (Anandakumar vd. 2008).



Şekil 2.5. PMMoV'nun biber yaprağı ve meyvesi üzerindeki simptomları **a)** PMMoV biber yaprağı üzerindeki simptomları, **b)** PMMoV'nun biber meyvesi üzerindeki simptomları

2.4. PMMoV'in Dünya Üzerindeki Yayılımı

Pepper mild mottle virus (PMMoV) Dünya'da ve ülkemizde biber yetiştiriciliği yapılan alanlarda ekonomik anlamda büyük zararlar meydana getiren viral bir hastalıktır. *Biber hafif benek virüsü* (PMMoV) ilk olarak 1952 yılında McKinney tarafından Güney Carolina'da rapor edilmiştir. Biber hafif benek virüsü (PMMoV) ilk kez İtalya'da 1984 yılında tanımlanmıştır (Wetter vd. 1984). Bu tarihten itibaren dünyanın farklı alanlarına yayılarak özellikle biber üretim alanlarının en önemli patojenleri içerisinde yerini almıştır.

Almasi vd. (2017) yaptıkları çalışmaya göre biber yetiştiriciliği yapılan alanlarda 1970-80 yılları arasında verim parametrelerini sınırlandıran en önemli virüs hastalıkları olarak *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Potato virus Y* (PVY), *Broad bean wilt virus* (BBWV), *Potato X virus* (PVX), *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Tobacco mosaic virus* (TMV) ve *Tomato mosaic virus* (ToMV) olarak belirtmişlerdir. Günümüzde ise biber üretim alanlarının en büyük sorunu olarak *Cucumber mosaic virus*, PMMoV'nin 3 patotipi ve TSWV'nin NT (normal tip) ile RB (dayanıklılığı kıran) olarak belirlemişlerdir. 2007'den bu yana dünyanın farklı bölgelerinden PMMoV'nin biber üretim alanlarında gerçekleştirdiği zararlara ait raporlar oluşturulmaktadır (Kim vd. 2011; Lee vd. 2004) ve her geçen gün bu raporların sayısında artış yaşanmaktadır. Şekil 2.6'da PMMoV'nin dünya genelindeki dağılımı paylaşılmıştır. Dünyanın birçok bölgesinde PMMoV'e ait farklı patotipler rapor edilmiştir. Güneydoğu Avrupa'da TMV, ToMV, TMGMV ve PMMoV baskın (Moury ve Verdin 2012) Güneydoğu Asya'da PMMoV ve ToMV daha yaygın olduğu belirtilmiştir (Kenyon vd. 2014).



Şekil 2.6. PMMoV'nin dünya genelindeki dağılımı

2.5. PMMoV Dünyada ve Türkiye'deki Durumu ve Bu Hastalık İçin Kullanılan Dayanıklılık Kaynakları

*Tobamovirus*lerin biber alanlarının en önemli sorunu olduğu bilinmektedir ve son yıllarda bu grubun üyesi olan PMMoV, üretim yapılan tarla ve seralarda meyveler üzerinde ciddi simptomlara ve biber üretiminde önemli verim kayıplarına neden olduğu belirtilmiştir (Güldür ve Çağlar, 2006). Bu virüs, tarla ve sera yetiştiriciliğinde önemli ölçüde ürün kaybına veya azalmaya neden olur (Jarret vd. 2008). *Capsicum* cinsine ait bazı kültür bitkilerinin *Tobamovirus*lere karşı hipersensitif yanıtlar aracılığı ile dayanıklılık sağladığı bilinmektedir ve bu genler hiyerarşik olarak *L1*, *L1a*, *L2*, *L3* ve *L4* olarak sınıflandırılmıştır (Boukema 1983; Sawada vd. 2004). *L* genleri aracılığı ile *Tobamovirus*lerin P0, P1, P1,2 veya P1,2,3 patotipleri üzerinde dayanıklılık sağladığı belirlenmiştir. PMMoV'ye karşı dayanıklılık *L1*'den *L4*'e kadar sıralanabilen 4 adet dayanıklılık geni tarafından sağlanmaktadır (Boukema vd. 1984). P0 patotipine ait virüsler, herhangi bir *L* geni taşıyan bitkilere bulaşamaz. Benzer bir şekilde virüslerin ait olduğu P1, P1.2 ve P1.2.3 patotipleri sistematik olarak sırasıyla *L1* ve *L1a* genlerini; *L1* ve *L2* genlerini ve *L1* ile *L3* genlerini enfekte edebilmektedir (Bowkema 1984;Sawada vd. 2005). Ek olarak, farklı sıcaklıklara bağlı alleller *L1a*, *L1c* ve *L2b*, *C. annuum* cv. KC780, *C. chinense* KC667 ve *C. baccatum* PI 439381-1-3 üzerinde tanımlanmıştır (Tomita vd. 2011). Bu sınıflandırmaya uygun olarak da dünyada bulunan PMMoV izolatları P1.2 veya P1.2.3 olarak adlandırılmıştır (Rast 1988). *Tobamovirus* kılıf proteinine (CP, coat protein) karşı sağlanan dayanıklılıkta *L* geninin rolü çok büyüktür ve *L* geni aracılığı ile sağlanan dayanıklılıkta viral patotip tayininde de belirleyici faktör olarak karşımıza çıkmaktadır (Berzal vd. 1995; Dardick vd. 1999; Gilardi vd.1999;

Hamada vd.2006; Tsuda vd. 1998). Gen için gen” kavramı, Flor (1971) tarafından bazı patojen-bitki etkileşimlerdeki dayanıklılık reaksiyonunu açıklamak için önerilmiştir. Bu sistem ile konukçuda bulunan bir gen ile patojen arasındaki ilişkiye göre konukçuda dayanıklılık cevaplarını içermektedir. *L* genleri aracılığı ile bitkilerde HR yanıtları yanıtları oluşturularak PMMoV’a ait enfeksiyonlar önlenmektedir. Kenyon vd. (2014) belirttikleri *L* genlerine ait dayanıklılık kaynakları ve dayanıklılık sergiledikleri virüsler Çizelge 2.1.’de gösterilmiştir.

L genleri biber bitkilerinin 11. kromozomu üzerinde konumlanmıştır (Lefebvre vd. 2002) ve *L4* lokusu monogenik dominant bir dayanıklılık sergilediği rapor edilmiştir (Boukema, 1983; Van Duin, 1998).

L genlerinin dayanıklılığını baz alan birkaç araştırmacı PMMoV'nin P1.2.3 patotipinin bu dayanıklılığın üstesinden gelebildiğini rapor etmişlerdir (Tsuda vd. 1998; Velasco vd. 2002; Matsunaga vd. 2003; Kim vd. 2008).

Çizelge 2.1. *L* genleri ve sağladıkları dayanıklılık (Kenyon vd. 2014)

		Virüs Türleri ve Patotipler				
		TMV, ToMV, TMGMV, BPMoV	PaMMV, ObPV	PMMoV	PMMoV	PMMoV
Dayanıklılık Kaynağı	Genotip	P0	P1	P1.2	P1.2.3	P1.2.3.4
<i>C. annuum</i> Early Cal Wonder	<i>L+</i> / <i>L+</i>	S	S	S	S	S
<i>C. annuum</i> Tisana	<i>L1</i> /–	R	S	S	S	S
<i>C. annuum</i> Oonatsume	<i>L1a</i> /–	R	R#	S	S	S
<i>C. frutescens</i> Tabasco	<i>L2</i> /–	R	R	S	S	S
<i>C. chinense</i> PI159236	<i>L3</i> /–	R	R	R	S	S
<i>C. chacoense</i> PI260429	<i>L4</i> /–	R	R	R	R	S
<i>C. annuum</i> NanbuOhnaga	Hk	S	R*	S	S	S

S: Hassas, R: Dayanıklı, R#: dayanıklı <24 C'e kadar, R*, Dayanıklı >30 C. **TMV**, Tobacco mosaic virus; **ToMV**, Tomato mosaic virus; **TMGMV**, Tobacco mild green mosaic virus; **BPMoV**, Bell pepper mottle virus; **PaMMV**, Paprika mild mottle virus; **ObPV**, Obuda pepper virus; **PMMoV**, Pepper mild mottle virus

PMMoV 1980'li yıllarda *Capsicum* türlerini enfekte edebilen TMV benzeri virüs olarak isimlendirilmiştir (Boukema vd. 1980). Bu izolat önceleri P14 olarak adlandırılmıştır. P14 straini üzerinde devam eden çalışmalar ile *C. chacoense*'nin (PI 260429 hattı) bu virüse dayanıklı olduğu belirlenmiştir (Boukema 1983). 1984 yılına gelindiğinde Boukema bu dayanıklılığın *L4* geni vasıtasıyla sağlandığını ve P14 strainin *L3* tarafından sağlanan dayanıklılığın da üstesinden gelebildiğini açıklamıştır.

Başlangıçta TMV benzeri olarak sınıflandırılan bu *L3* dayanıklılığını kıran P14 straini PMMoV'nin P1.2.3 patotipine ait olduğu belirlenmiştir.

Svoboda vd. (2002) yılında Çek Cumhuriyeti'nde biber yetiştirilme alanlarında viral enfeksiyon benzeri örnekler toplamışlardır. Bu örnekleri elektron mikroskobu altında incelemeye tabii tutarak viral partikülleri *Tobamovirus* ile eşleştirmişlerdir. ELISA ile test ederek bu örneklerin PMMoV'ye ait olduğunu doğruladıktan sonra bu izolatin hangi patotipe ait olduğunu belirlemeye çalışmışlardır. Yaptıkları çalışma ile Çek Cumhuriyetinde PMMoV'nin P1.2 patotipinin biber bitkilerini enfektelediği ama bu izolatin sınırlı bir alan içerisinde yer aldığını rapor etmişlerdir. Ruiz vd. (2016)İspanya'da biber bitkileri üzerinde virüs benzeri simptom gösteren sekiz örneği *Paprika mild mottle virus*, *Tobacco mosaic virus*, *Tomato mosaic virus*, *Tobacco mild green mosaic virus*, *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) ve *Cucumber mosaic virus*'e karşı DAS-ELISA yöntemi ile test etmişlerdir. Bu sekiz örnek PMMoV hariç diğer virüslere karşı negatif olarak bulunmuştur. Pozitif olarak bulunan PMMoV izolatu *C. chinense* PI159236, *C. chacoense* PI260429 ve 4 tane *L4* ve 2 tane *L3* dayanıklılığı olan biber bitkileri üzerinde mekanik inokulasyonu gerçekleştirilerek test bitkileri üzerinde oluşturduğu belirtiler incelenmiştir. Yaptıkları çalışma neticesinde İspanya'da PMMoV'in P1.2 izolatinin bulunduğunu ilk kez rapor etmişler ve kılıf proteinini RT-PCR teknikleri ile çoğaltarak 66. Pozisyonunda Alanin aminoasitinin Thiozin aminoasitine dönüşmesine neden olan bir mutasyonun varlığına işaret etmişlerdir.

Deri vd.(2018) yılında yürütmüş oldukları çalışmalarda PMMoV'nin patotipleri arasındaki farklılıkları belirleyebilmek için 231 nükleotid sekansı kullanarak araştırmalarını gerçekleştirmişlerdir. Elde ettikleri bulgulara göre izolatlar arasında birçok mutasyonun var olduğunu ve bu mutasyonların birçoğunun anlamsız mutasyonlar olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmaları kapsamında en doğru sonuca varabilmek için birden fazla tekrarlı analizler ile P1.2 ve P1.2.3 patotiplerini birbirlerinden ayırmak için replikaz ve kılıf proteinleri üzerindeki nükleotid içerikleri baz alınarak ayırım yapılabileceği sonucuna varmışlardır.

Sugitavd. (2004) yılında yaptıkları çalışmalarında P1.2 patotipinin Japonya'da yaygın olarak bulunurken P1.2.3 patotipine nadir oranlarda rastladıklarını rapor etmişlerdir. Genda vd.(2007)'de *Capsicum chacoense*'den gelen *L4* geni, en etkili dayanıklılık geni olup, *Biber hafif benek virüsüne* (PMMoV) karşı yeni dayanıklı çeşitler geliştirmiş olan Japonya'daki ıslah programlarında yaygın olarak kullanılmakta olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte 2004 yılında Japonya'daki üretim alanlarında *L4* geni içeren biber bitkilerinde hafif mozaik belirtileri saptanmıştır. Bu belirtilerin PMMoV'ye ait olduğu belirlendikten sonra bu patojenin P1.2.3.4 patotipine ait olduğu belirlenmiştir. PMMoV'nin Japonya'da tespit edilen P1.2.3.4 patotipinin kılıf protein üzerindeki iki aminoasit substitüsyonunun bu patotipin oluşmasında etkili olduğunu belirtmişlerdir. Bu mutasyon noktaları 46. pozisyonunda Gln ile Arg ve 85. pozisyonunda

Gly ile Lys'in olarak değişmesi yoluyla meydana geldiği ve bu olayında araştırmacılara *L4* dayanıklılığının kırıldığı sonucunu vermiştir.

Choi vd. (2016) yılında Güney Kore'de gerçekleştirdikleri çalışmalarında PMMoV'nin hem P2 hem de P3 izolatlarının tüm nükleotid dizilimlerini Sanger sekanslama yöntemi kullanarak elde etmişlerdir. Bu araştırma grubu 2013-2014 yıllarında PMMoV'nin kırmızıbiberler üzerinde P2 ve P3 patotipleri sayesinde *L3* ve *L4* dayanıklılığının kırıldığını rapor etmişlerdir (Choi vd. 2013;2014). PMMoV-P2 ve PMMoV-P3 farklı patojenisitelere sahip olmasına rağmen bu iki izolatında tüm nükleotid dizilimleri toplamda 6,356 nt olarak belirlenmiştir. Elde ettikleri verilere göre iki viral genomda 4 protein kodlanmaktadır. Bunlar; 126 kDa, 183 kDa, hareket proteini bir kılıf proteini ve 5' -3' UTR alanlarında (untranslated region) sırasıyla 69 nt ve 198 nt olduğunu rapor etmişlerdir.

Antignus vd. (2008) yılında İsrail'de gerçekleştirmiş oldukları çalışmalarında PMMoV'nin P1.2 ve P1.2.3 patotiplerinin yakından ilişkili olduğu konusu üzerinde yoğunlaşmışlardır. *L4* genotipine sahip bitkilerde ve hassas çeşitler üzerinde gelişen belirtilerin diğer patotiplere kıyasla daha şiddetli olduğunu vurgulamışlardır. Saptanan bu patotipin kılıf proteini üzerinde çalışarak P1.2 ve P1.2.3 patotipi ile karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırma sonucunda bu iki patotip arasında 47. pozisyonda Lözin yerine glutamin ve 87. pozisyonda alanin yerine gilisinin yer aldığı belirtilmiştir. P1.2.3.4 olarak adlandırılan bu yeni patotipin 87. pozisyonunda gilisinin yerine alanin aminoasidi bulunduğu rapor edilmiştir. Belirlenen bu patotipin diğer patotiplere göre daha agresif olduğunu yaptıkları araştırmalar ile ortaya koymuşlardır.

Yang vd. (2012) yılında *L4* geni için F2 popülasyonu üzerinde yaptıkları araştırmalarında *Tobamovirus* dayanıklılığı için başka bir gerekli genetik faktörün etkili olabileceği düşüncesini rapor etmişlerdir.

Ülkemizde de biberde *L3* dayanıklılık genini kıran izolata ait ilk rapor 2012 yılında gerçekleştirilmiştir (Çağlar ve Fidan 2012). Literatür taramasına göre Türkiye'de şu ana kadar *L4* geninin kırılması ile ilgili yayınlanmış bir çalışma bulunmamaktadır.

2.6. *L4* ve *L3* Geninin Belirlenmesi İçin Kullanılan Markırlar

L genleri biber bitkileri için *Tobamovirus*ler ile mücadelede kullanılan en önemli dayanıklılık kaynağıdır. Dolayısıyla bu dayanıklılık kaynağının biber bitkilerine aktararak dayanıklılık ıslahı çalışmalarında kullanılması gerekmektedir. Dayanıklılık ıslahı çalışmalarında en verimli yanıtı almak ve hem zamandan hem de emekten tasarruf yapmak için izlenilecek en önemli adımlardan biri moleküler yöntemler ile bu genlerin tespitinin doğru bir şekilde yapılmasıdır. *L* genleri ile dayanıklılık sağlanması için DNA markırları geliştirilmeye çalışılarak haritalama popülasyonları oluşturulmuştur. Sugita vd. tarafından 2004 yılında yapılan çalışmada Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik

DNAstratejisine dayalı RAPD markır sistemi kullanarak *L3* lokusuna 4.0 cM uzaklıkta markır geliştirmeyi başarabilmişlerdir.

L4 dayanıklılık geninin monogenik baskın karakterli bir gen olduğu bilinmektedir (Boukema, 1983; Van Duin, 1998). Bununla birlikte *L4* geninin PMMoV'ye dayanıklılığının ışlahçılar tarafından melezleme sonucunda homozigot hatlardan geldiği düşünölmektedir.

Dayanıklılık ışlahını başarılı bir şekilde gerçekteştirmek adına devamındaki çalışmalar ile *L4* genine en yakın konumlanmayı başaran markırın geliştirilmesi çalışmaları gerçekteştirilmiştir. Matsunaga vd. (2003) yılında *L4* ile bağlantılı RAPD markırlarını geliştirmişlerdir. *L4* lokusuna 1.5 cM uzaklıkta bulunan WA31-1500 RAPD markırı SCAR markıra dönüştürölmüştür. **Ap-7** ve **AP-8** SCAR markırlardır. Bu markırların *L4* lokusuna uzaklığı **1.5 cM** olarak tahmin edilmektedir (Matsunaga vd. 2003). Kim vd. (2008) yılında başka bir haritalama çalışması yaparak *L4* ile bağlantılı üç AFLP markırının olduğunu belirlemişlerdir ve en yakın işaretleyici olarak L4SC340 markırını bir SCAR markıra dönüştürmüşlerdir. Bu marker iki popölasyona ait bireylerde test edildiğinde, *L4* markırından **0.9 ve 1.8 cM** uzakta haritalandığı belirlenmiştir. Bu tür markır çalışmaları *L4* geninin haritalanmasına katkı sağladığı gibi *L3* ile *L4* arasındaki allelik ilişkisinin aydınlatılmasına da harika bir fırsat sunmaktadır.

Tomita vd. (2008)'de ise *L3* lokusunda 0.1 cM'dan daha yakın bir alanda konumlanmış markırları bulked segregant analiz-çoğaltılmış fragment uzunluğu polimorfizmi (BSA-AFLP) ve dayanıklı gen analogları (RGA) haritalama tekniklerini kullanarak geliştirdiklerini belirtmişlerdir.

Yang vd. (2009) yılında kromozom 11 üzerindeki R genleri arasındaki ortolog ilişkiyi araştırmak istemişlerdir. Bu amaç doğrultusunda patatesteki R3/R7 lokusu, domates içerisindeki I2 lokusu ve biberdeki L lokusu arasındaki karřılařtırılmalđ genomik bir çalışma gerçekteştirmişlerdir. TMV ve PMMoV dayanıklılık genlerinin bulunduğu L lokusu biberde kromozom 11, patatesteki R3 lokusu ve domateste I2 lokusu üzerinde bulunmaktadır (Yang vd. 2009). Bağlantı (Linkage) analizlerine göre BAS 082F03 klonu kromozom 11 üzerinde TG36 yakınlarındaki hedef bölgede bulanabileceğini göstermiştir. 082F03 sekansı kullanılarak daha fazla BAC klonu tanımlanmıştır ve 224 kb uzunluğuunda bir BAC kolonu ile kontig yapılmıştır. Gen tahmin analizleri ile BAC kontiği içeresinde en az I2/R3 R geni analogu (RGAs) olduğunu göstermiştir. BAC kontig dizisi kullanılarak *L4* geninin yaklaşık 1.2 cM yakınında konumlanmış üç DNA markeri geliştirilmiştir. **087H3T7** tek nükleotid polimorfizmine dayanan yöntemler ile geliştirilmiştir ve *L3-L4* segregasyon çalışmalarında kullanılmıştır. *L3* markırı ile birlikte segregasyona uğradığı bilinen **189D23M** markırı, **087H3T7** karşı tarafında (zıt) konumlanmış ve *L4* genininden yaklaşık **0.7 cM** uzaklıktadır. Bu fikir *L3* ve *L4* genlerinin aynı lokus üzerinde farklı alleler olduğu yerine birbirine yakından bağlantılı farklı genler olabileceği düşünçesini oluşturmuştur.

Yang vd. (2009) *L4* için bir başka markır daha geliştirerek katkıda bulunmuşlardır. Tomita vd. (2008) **189D23M** markırı ve Yang vd. (2009) geliştirdikleri SNP markeri **087H3T7HRM**'ının *L4* lokusu ile yakın konumlandığını belirtmişlerdir.

Yang vd. (2009) *L3* ve *L4* markırları arasındaki genetik uzaklığın *C. annuum/C. chinense* veya *C. annuum/C. chacoense* arasında meydana gelen melezler arasında farklılıklar gösterebileceğini belirtmişlerdir.

L lokusu daha önce kromozom 11 üzerinde RFLP markırı TG36'dan 5.2 cM uzaklıkta haritalanmıştır (Paran vd. 2004). Biber genomunun bu bölgesi patates için R3/R7 bölgesine ve domatesteki l2 bölgesine denk gelmektedir. Kim ve ark (2008) yaptıkları çalışmalarında L4SC340 markırının *L4* lokusuna yaklaşık 1.8 cM uzaklığında olduğunu rapor etmişlerdir.

Boukema (1984)'de *L3* ve *L4* genlerinin PMMoV dayanımında allelik olduğu önceden rapor etmiştir. Tomita vd. (2008) yılında *L3* için (*C. chinense*) geliştirdikleri markırların *L4* geninin tespiti için kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Yang vd. (2009), Tomita vd. (2008) verilerine ek olarak *L4* ve *L3* 'ün allelik olmayabileceğini belirtmişlerdir.

Lee vd. (2012) L1-SCAR, L3-SCAR, L4-SCAR ve L0c-SCAR markırları olarak *L* lokusuna ait spesifik allelleri içeren markır seti dizayn etmişlerdir.

L genlerinin moleküler markır yöntemi ile tespiti için birçok araştırmacı tarafından farklı çalışmalar yürütülmüştür. Bu çalışmaların genel amacı *L* genlerinin en doğru tespitinin gerçekleştirilmesi ve *L* genlerini temel alan dayanıklılık ıslahı çalışmalarına katkı sağlayabilmektir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Yürütmüş olduğumuz çalışmanın materyallerini *L4* geni barındırmayan bir adet hassas çeşit ile *L4* genine sahip olduğu beyan edilen, yerli ve uluslararası tohum firmalarının 5 adet biber çeşidi, laboratuvar malzemeleri, tampon çözeltiler, moleküler tanı amacıyla yapılacak olan PCR ve RT-PCR analizinde kullanılacak spesifik primerler, dayanıklılık geninin belirlenmesinde kullanılacak moleküler markırlar, enzimler ve diğer kimyasallar, güç kaynağı, yatay elektroforez aparatı oluşturmuştur.

PMMoV ile bulaşık örnekler üzerinden bitki özsuvarı elde edilmesinde porselen havan ve havaneli tercih edilmiştir. Laboratuvar çalışmaları esnasında hassas terazi, vorteks cihazı (Vortex-GENE2), cam ve plastik malzemeler kullanılmıştır. RT-PCR çalışmaları için BIO-RAD firmasının T100 Thermal Cycler cihazı, ürünlerin jel üzerinde görüntüsünün elde edilmesi için Thermo Scientific firmasının jel elektroforez cihazı, Jel görüntüleme için ise BioDocAnalyze firmasının Biometra cihazı kullanılmıştır.

Mekanik inokulasyon çalışmasından sonra elde edilen bitki örnekleri üzerinde PMMoV'nin varlığını moleküler yöntemler ile saptayabilmek için RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polimeraz Chain Reaksiyon) yöntemi kullanılmıştır. RT-PCR çalışmaları için Thermo Fisher Scientific (Fermantas, Vilnius, Lithuania) tarafından sağlanmış olan enzimler, enhanser ve master mix kullanılmıştır. Çizelge 3.1.'de denemede kullanılan çeşitlerin bilgileri ve dayanıklılık durumları belirtilmiştir. Çizelge 3.2.'de kullanılan çeşitlere ait özellikleri paylaşılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan bitkilerin *L4* geni bakımından durumları

Çeşitler	<i>L4</i> gen durumu
B1	-
L4B2	+
L4B3	+
L4B4	+
L4B5	+
L4B6	+

Çizelge 3.2. Denemede kullanılan çeşitlere ait bilgiler

Çeşit	Tip	Dayanım	Çeşide ait görüntü
B1	Dolma biber, Standart çeşit, Yazlık erkenci	Hassas	
L4B2	Kırmızı Kaliforniya Wonder tipi biber, güçlü, erkenci, boğum araları orta, soğuk toleransı çok iyi, yüksek verimli.	HR: Tm:0-3 (L4) IR: TSWV	
L4B3	Dolma, güçlü, çokerkenci, verimli.	HR: Tm:0-3 (L4) IR: TSWV	
L4B4	Şili biberi, güçlü, soğuk dönemde yüksek meyve tutumu, yeşil ve kırmızı hasada uygun.	HR: Tm:0-3 (L4) IR: Lt / Ma/Mi/Mj	
L4B5	Kırmızı Kaliforniya biber. Güçlü bitki yapısına sahip. Yüksek kış performansı ve bahar yenilenmesi.	HR: Tm:0-3 (L4) IR: TSWV:0 / Ma/Mi/Mj	
L4B6	Kırmızı Kaliforniya Wonder tipi biber.	HR: Tm:0-3 (L4) IR: TSWV:0	

Fidelik ortamında yetiştirilen fideler torf, hayvan gübresi ve toprak karışım içeren saksılara şaşırtılmıştır. *In vivo*'da yapılan denemelerde dışardan gelebilecek zararlılara karşı 40 mesh böcek tülü kullanılmıştır. Tül içerisine mavi ve sarı yapışkan tuzaklar asılmıştır. Bitkilere deneme süresi boyunca 7 gün aralıklarla thrips, beyazsinek, kırmızı örümcek ve yaprakbiti ilaçları uygulanmıştır. Kullanılan insektisitlerin aktif maddeleri Çizelge 3.3'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.3. Denemede kullanılan insektisitler ve aktif maddeleri

Zararlı Adı	Aktif Madde ve Oranı	Kullanım Dozu
Çiçek thrips (Frankliniella occidentalis)	Spinosad 480g/L	30ml / 100L suya
Tütün beyazsineği (Bemisia tabaci)	Pyriproxyfen 100g/L	50ml / 100L suya
Kırmızı örümcekler (Tetranychus spp.)	Abamectin 18g/L	25ml / 100L suya
Şeftali yaprakbiti (Myzus persicae)	Acetamiptrid %20	25gr / 100L suya

Sulama suyu olarak 18.18.18+2Mg+ME gübrelili su kullanılmıştır. Kullanılan gübrenin besin elementi içerikleri Çizelge 3.4'te verilmiştir. Kullanılan gübrelili suyun EC oranları 1,2 - 1,6 mS ve pH'ları 6,5 – 7,0 arasında ölçülmüştür. Deneme hem serada hem de iklim odasında 5 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Denemeler esnasında sera içinde herhangi bir suni ışıklandırma veya ısıtma yapılmamıştır. İklim odasında ise bitkiler floresan lambalarla ışıklandırılmış (16 saat aydınlık, 8 saat karanlık) ve iklim odasının sıcaklığı 25 °C'de tutulmuştur.

Çizelge 3.4. Test bitkilerinde sulama suyunda kullanılan gübre içeriği

İçerik	%w/w
Toplam Azot (N)	% 18
Amonyum Azotu (N-NH ₄)	% 3,5
Nitrat Azotu (N-NO ₃)	% 5
Üre Azotu (N-NH ₂)	% 9,5
Suda Çözünür Fosforpenta Oksit (P ₂ O ₅)	% 18
Suda Çözünür Potasyum Oksit (K ₂ O)	% 18
Suda Çözünür Magnezyum Oksit (MgO)	% 2
Suda Çözünür Bor (B)	% 0,01
Suda Çözünür Bakır (Cu) (EDTA şelatlı)	% 0,005
Suda Çözünür Demir (Fe) (EDTA şelatlı)	% 0,05
Suda Çözünür Mangan (Mn) (EDTA şelatlı)	% 0,02
Suda Çözünür Molibden (Mo)	% 0,003

Suda Çözünür Çinko (Zn) (EDTA şelatlı)	% 0,007
--	------------

3.2. Metot

3.2.1. PMMoV'nin *L4* geni vasıtasıyla sağladığı dayanıklılık durumunun belirlenmesi

Biber bitkileri üzerinde *L4* geninin PMMoV enfeksiyonlarına karşı oluşturduğu tepkilerin belirlenmesi amacıyla virüs, bitkilere mekanik inokulasyon yöntemi ile bulaştırılmıştır. Buradan elde edilen sonuçlar doğrultusunda *L4* geninin PMMoV'a karşı dayanıklılık durumları fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. Şekil 3.1'de bitkilere PMMoV mekanik inokulasyonu gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Bitkilere mekanik inokulasyon aşaması



Şekil 3.2. Mekanik inokulasyon sonrasında bitkilerde meydana gelen belirtiler; **a)** *L4* geni bulunan çeşitlerde meydana gelen hipersensitif reaksiyonlar **b)** Hassas bitkiler üzerinde meydana gelen belirtiler

3.2.2. Test bitkilerinin *L4* dayanıklılıklarının belirlenmesi

Biberler üzerinde PMMoV'ye yönelik yürütülen ıslah çalışmalarında kullanılan *L4* geni, bu hastalığa karşı dayanıklılık durumlarının belirlenmesinde spesifik bir noktadır. Bu genin dayanıklılık aktivitesinin çok yüksek olduğunun birçok araştırmacı tarafından rapor edilmesi ve Antalya bölgesinde PMMoV'ye ait şikâyetlerin artması neticesinde bizleri en doğru sonuca ulaştıracak olan moleküler markırı bulmaya yönlendirmiştir. Bu amaç doğrultusunda 6 test bitkisi, biberde *L4* geninin tespitinde yayınlanmış ve kabul gören primerler; L4SC340 (Han ve Kim 2008), AP-7/AP-8 (Matsunaga vd. 2003), 060I2END- 087H3T7 (Yang vd. 2008), P118/P119 (Lefebvre vd. 2002) ile test edilmiştir. Kullanılan primerlere ait bilgiler Çizelge 3.5.'te paylaşılmıştır. *L4* geninin moleküler olarak belirlenmesinde kullanılan PCR protokolü Çizelge 3.6'da paylaşılmıştır.

Çizelge 3.5. *L4* dayanımını belirlemek için kullanılan primerlere ait bilgiler

Marker	Primer İsmi	Primer dizilimi 5' 3'	Boyut	Tip	Anneli g
087H3T7	087H3T7F	CCTTTGCCTGCATTATTCTTG	440	Codominant	62
	087H3T7R	GCCCAAATTTATTCCCAAATGC			
060I2END	060I2END-2F	GCACATCAGCAGGTTTAGTACG	751	Dominant	62
	060I2END-2R	CCAACTGTCAAACCTCGG			
L4SC340	L4SC340F	AAGGGGCGTTCTTGAGCCAA	340		53
	L4SC340R	TCCATGGAGTTGTTCTGCAT			
AP-7/AP-8	AP-7	CGTACTGTGGCTCAAACTC	1400		58
	AP-8	ATTCGCACCGTTTAGCCCGT			
P118/P119	P118	AATCCTTCAACTGCCATTTC	350		58
	P119	ATTGGGACATGAGGTGTGTA			

Çizelge 3.6. Moleküler analizler için kullanılan PCR bileşenleri

PCR Bileşenleri	Miktar
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	23 µL
Forward primer	0.1-1.0 µM
Reverse primer	0.1-1.0 µM
Template DNA	10 pg - 1 µg
Su	23 µL

Bitkilerin *L4* dayanımları belirlendikten sonra PMMoV izolatının test bitkileri üzerindeki durumlarının belirlenmesi amacıyla mekanik inokulasyon çalışmalarına geçilmiştir.

Yürütülen tez çalışması sırasında biber bitkileri Akdeniz Üniversitesi Fitopatoloji seralarında muhafaza edilmiştir. Bitkiler üzerinde mekanik inokulasyon çalışmaları için %0,1'lik 2-mercaptoethenol içeren solüsyon 1:5 (w/v) oranında hazırlanmış 0,02 M Fosfat tampon (pH:7) çözeltisi olarak kullanılmıştır. PMMoV izolatı porselen havanlarda ezilmiş ve aynı bitkiler üzerinde, farklı zamanlarda, 5 tekerrürlü mekanik inokulasyon işlemi yapılmıştır. Şekil 3.3'te mekanik inokulasyon çalışmalarına ait bir görsel paylaşılmıştır.



Şekil 3.3. PMMoV izolatının *L4* geni bulunan ve bulunmayan çeşitler üzerinde mekanik inokulasyon uygulanması

3.2.3. Test bitkileri üzerinde PMMoV'nin moleküler yöntemler kullanılarak belirlenmesi

Hassas ve dayanıklı test bitkiler üzerinden yaprak örnekleri alınarak total nükleik asit izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Total nükleik asit ekstraksiyonu için kullanılan kimyasallar Ek1'de paylaşılmıştır).

Hassas ve dayanıklı test bitkileri üzerinde bazı simptomların meydana gelmesiyle birlikte bu bitkilerin sadece PMMoV ile bulaşık olduğunun belirlenmesi amacıyla biberde en sık rastlanan 14 virüse karşı RT-PCR işlemi uygulanmıştır. Bu işlem bitkilerin sadece PMMoV ile enfekteli olduğunun doğrulanması ve aynı zamanda karışık enfeksiyonların var ise bu durumun belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için kullanılan primer bilgileri Çizelge 3.7'de paylaşılmıştır.

Çizelge 3.7. RT-PCR çalışmalarında kullanılan primer çiftleri

Virüs	Primer İsmi	Ürün boyu (bp)	PCR Şartları	Referans
ToCV	ToCVF ToCVF	340 bp	60 C° 30 sn	Pehlivan 2013
EMDV	EMDVF EMDVR	400	58 C° 30 sn	Mavric 2011
AMV	AMV (F) AMV (R)	700	52 C° 30 sn	Buzkan ve Yüzer (2009)
ChiVM V	D (F) E (R)	788	56 C° 30 sn	Moury vd. (2005)
CMV	CMV (F) CMV (R)	513	52 C° 30 sn	Buzkan ve Yüzer (2009)
PMMoV	P12/3 (F) P12/3A (R)	836	53 C° 30 sn	Buzkan ve Yüzer (2009)
PepMoV	P3 (F) M4 (R)	345	52 C° 30 sn	Eman (2006)
PVMV	D (F) E (R)	737	50 C° 30 sn	Mouryvd. (2005)
PVX	PVX (F) PVX (R)	562	58 C° 30 sn	Fidan vd. (2011)
PVY	PVY (F) PVY (R)	480	54 C° 45 sn	Fidan vd. (2011)
TEV	TEV-CP2-F TEV-CP2-R	391	54 C° 30 sn	Lee vd.(2011)
TMV	TMV(F) TMV(R)	880	56 C° 45 sn	Kumar vd. (2011)
ToMV	ToMV(F) ToMV(R)	318	56 C° 45 sn	Kumar vd. (2011)
TSWV	L1TSWVR L2TSWVF	276	52 C° 30 sn	Adkins vd. (2005)
TYLCV	VP2715 RVC427	543	52 C° 1 dak	Anfoka vd. (2008)

Biber bitkilerden yaprak örnekleri alınarak RT-PCR çalışmalarında kullanabilmek için Thermo Scientific–RNA izolasyon kiti ile bitkilerden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA’lar spektrofotometrede optimize edilerek (A260/280 1.8-2.0) konsantrasyonları 200 ng/ul olacak şekilde ayarlanmıştır. RNA optimizasyonu yapıldıktan sonra Thermo Scientific Verso 1-StepRT-PCR Kit ReddyMix kullanılarak Tek aşamalı RT-PCR çalışmaları yürütülmüştür. Elde edilen RT-PCR ürünleri %1,5 lik agaroz jelde yürütülmüş Ethidium bromide ile boyandıktan sonra Biometra jel görüntüleme cihazında UV altında görüntülenerek kaydedilmiştir.

RT-PCR çalışmaları için Thermo Scientific markasının RT-PCR kiti kullanılmıştır. RT-PCR kit içerikleri Çizelge 3.8’de ve RT-PCR döngüsü Çizelge 3.9’da paylaşılmıştır.

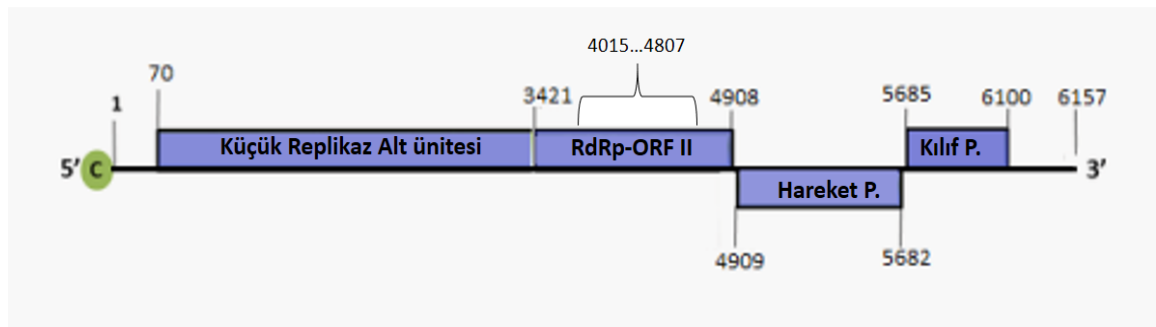
Çizelge 3.8. RT-PCR çalışmasında kullanılan kitin içerikleri

İçerik	Hacim μ L	Son Konsantrasyon
Verso Enzim Mix	0.5	
2X-1- Step PCR ReddMix*	12.5	1X
RT Enhanser	1.25	
Forward primer (10)	1	200 nM
Reverse primer (10)	1	200 nM
(RNA)	2	1 ng
ddH ₂ O	6.75	
Toplam	25	

Çizelge 3.9. PCR çalışmasında kullanılan PCR protokolü

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
Ön Denaturasyon	50	15	1 cDNA yapımı
	95	15	
Denaturasyon	94	1	35
Bağlanma	57-50		
Uzama	72		
Son uzama	72	5	1

PMMoV *Tobamovirus*ler içerisinde yer alan yaklaşık 6.3 kb büyüklüğünde genoma sahip bir replikaz genomu (126 kDa, 183 kDa), bir hareket proteini ve bir kılıf proteininden meydana gelmektedir. Buzkan ve Yüzer (2009)’in geliştirdikleri PMMoV tanılama primerleri kullanılarak PMMoV-Kum izolatının 4015...4807 aralığı ampifikasyona uğratarak genom bilgileri elde edilmiştir. PMMoV-Kum izolatının 183 kDa bölgesine ait sekans bilgileri elde edilmiştir ve Şekil 3.4’te bu primerlerin taradıkları alanlar işaretlenmiştir.



Şekil 3.4. PMMoV-Kum izolatının çoğaltılan alanı

Elde edilen veriler soy ağacının oluşturulması aşamasında elde edilen RT-PCR ürünlerinin doğrudan genoma ait dizi analizleri yapılmıştır. Bu amaçla RT-PCR’da 50 µl hacimde çalışılarak 10 µl’lik hacim jelde yürütülmüş ve 40 µl’lik kalan kısmı dizi analizi hizmeti almak için gönderilmiştir. Dizi analizi hizmetinde Sentebiolab firmasından hizmet alımı gerçekleştirilmiştir. Dizi analizleri sonucunda elde edilen veriler CHROMAS v.2.6.4 (Technelysium Pty. Ltd.), BIOEDIT v.7.2.5 (Hall 1999) ve Mega7 (Kumar vd. 2011) programları kullanılarak düzenlenmiştir. CHROMAS programı ile yaklaşık 806 bp uzunluğunda olan ürünlerin forward ve reverse dizilerinin baş ve son kısımlarındaki okuma kirlilikleri silinmiştir. Daha sonra forward ve reverse dizileri BIOEDIT programında üst üste denk getirilerek okuma doğrulanmış ve olası baz kaymaları düzeltilmiştir. Çalışmaya ait olan tüm hizalama (alignment) ve filogenetik analizler MEGA7 programı ile yapılmıştır.



4. BULGULAR

Yürütmüş olduğumuz tez çalışmasında Biber hafif benek virüs'ünün (PMMoV) *L4* vasıtasıyla sağlanan dayanıklılık yanıtları tespit edilmiştir. *L4* gen aktivasyonunun belirlenmek için 1 hassas (B1) ve 5 adet ticari olarak *L4* geni barındırdığı beyan edilen çeşit (L4B2, L4B3, L4B4, L4B5, L4B6) test bitkisi olarak kullanılmıştır. Hassas ve dayanıklı test bitkileri üzerinde PMMoV izolatu bulaştırılarak bu bitkilerin virüse karşı sergiledikleri dayanıklılık durumları belirlenmeye çalışılmıştır.

L4 geni içeren test bitkilerinin PMMoV izolatına gösterdiği tepkiler tez çalışması boyunca hem fenotipik hem de genotipik kriterlere göre gözlemlenmiştir. Bitkilerin sergilemiş oldukları fenotipik ve genotipik reaksiyonlar birleştirildiğinde geriye belirlenmesi gereken bir diğer konu *L4* genini en iyi belirleyen markırların tespitidir. Bunun için daha önceden rapor edilmiş olan L4SC340, AP-7/AP-8, 060I2END, 087H3T7, P118/P119 markırları seçilerek en doğru yanıt veren markır belirlenmeye çalışılmıştır.

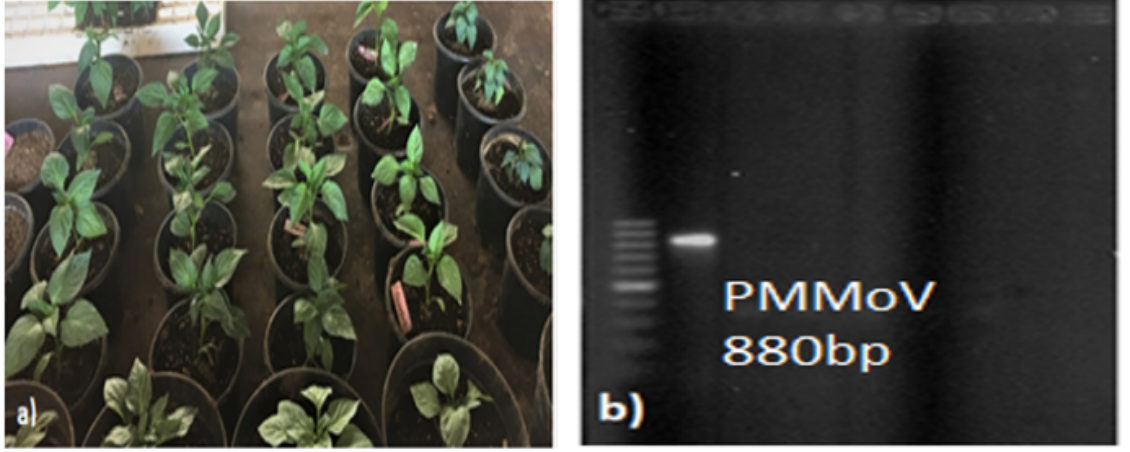
4.1. PMMoV İzolatının Elde Edilmesi, Test Bitkilerine İnokulasyonu

Gerçekleştirmiş olduğumuz tez çalışması kapsamında PMMoV izolatu Antalya il ve ilçelerinde yoğun olarak biber yetiştiriciliği yapılan seralardan elde edilmiştir. Özellikle Kumluca bölgesinden gelen yoğun şikayetler bu tezin çalışma yönünü belirlemiştir. Yürütülen tez çalışması kapsamında farklı iklim koşullarının *L4* geninin verimli çalışmasını etkileyip etkilemediği belirlenmek istenmiştir. Denemeler 4 farklı dönemde biber bitkilerinin farklı ortamlarda (iklimlendirme odaları ve sera) ve farklı sıcaklık dönemlerinde (ilkbahar, yaz, sonbahar ve kış periyodlarında) PMMoV enfeksiyonlarına karşı verdikleri tepkiler belirlenmiştir. Bu amaç doğrultusunda oluşturulan plan Çizelge 4.1'de paylaşılmıştır.

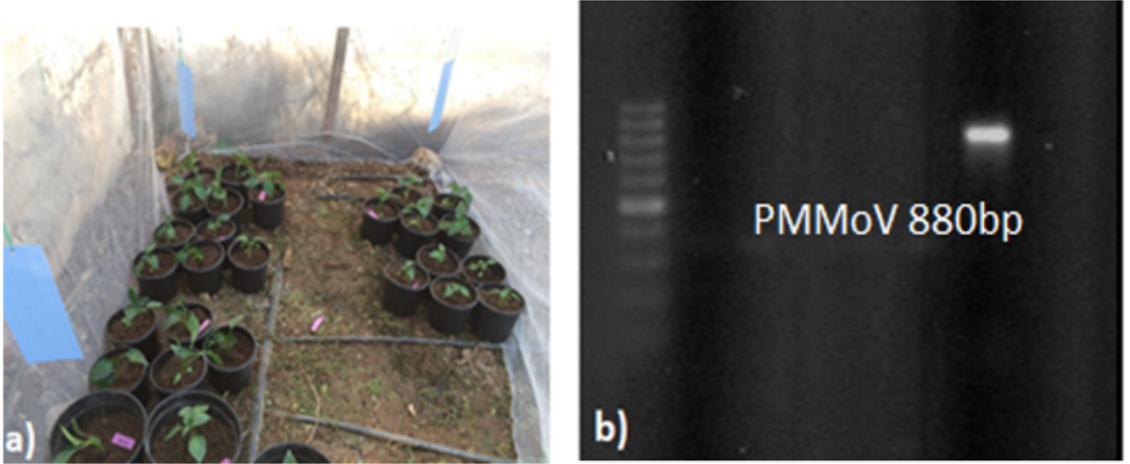
Çizelge 4.1. PMMoV-Kum izolatı için oluşturulan deneme planı

Deneme Sayısı	Deneme Süresi	Ortalama Sıcaklık	İnokulasyon Tarihleri	Moleküler Test Tarihleri	Yer
I	Bş:23.09.18 Bt:01.12.18	15,8 °C	I:24.09.17 II:04.09.17 III:14.10.17 IV:25.10.17 V:05.11.18	10.12.18	Sera
II	Bş:10.01.18 Bt:25.03.18	11,2 °C	I:12.01.18 II:21.01.18 III:03.02.18 IV:13.02.18 V:23.02.18	27.03.18	Sera
III	Bş:01.04.18 Bt:27.07.18	25-28 °C	I:02.04.18 II:05.04.18 III:15.04.18 IV:25.04.18 V:06.05.18	13.07.18	İklimlendi rme Odası
IV	Bş:01.07.18 Bt: 25.10.18	25-28 °C	I:02.07.18 II:06.07.18 III:14.08.18 IV:27.08.18 V:05.10.18	24.10.19	İklimlendi rme Odası
V	Bş:02.11.18 Bt:30.03.19	11,3 °C	I:03.11.18 II:08.11.18 III:18.11.18 III:01.012.18 IV:11.01.19 V:21.01.19	25.03.19	Sera

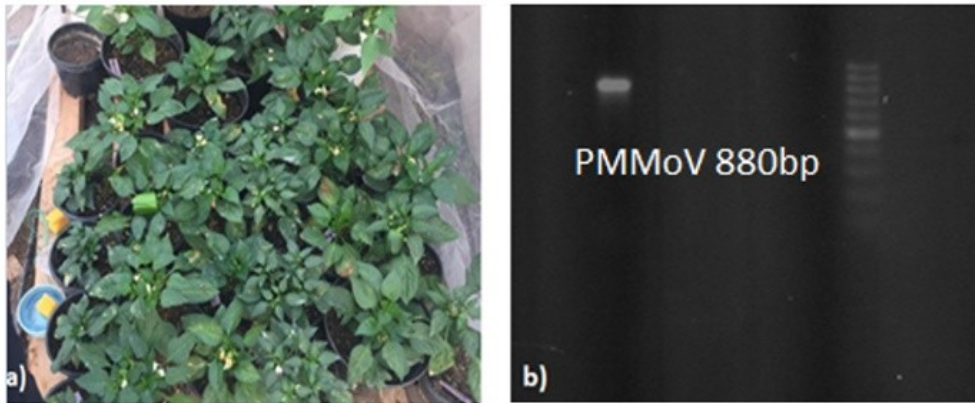
Her bir denemeye ait görüntüler ve RT-PCR sonuçları Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te paylaşılmıştır.



Şekil 4.1. 23.09.18-01.12.18 tarihleri arasında kurulan denemeye ait görüntüler; **a)** PMMoV-Kum izolatının mekanik inokulasyon sonrası görüntüleri **b)** PMMoV varlığının moleküler olarak karakterizasyonu.



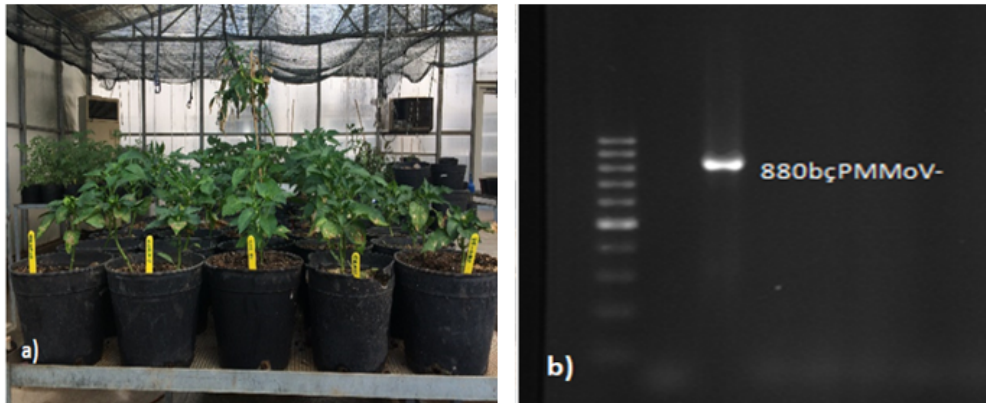
Şekil 4.2. 10.01.18-25.03.18 tarihleri arasında kurulan denemeye ait görüntüler; **a)** PMMoV-Kum izolatının mekanik inokulasyon sonrasına ait gözlemleri, **b)** PMMoV'in varlığının moleküler olarak belirlenmesi



Şekil 4.3. 01.04.18-27.07.28 tarihleri arasında kurulan denemeye ait görüntüler
a) PMMoV-Kum izolatının mekanik inokulasyon sonrasında meydana getirdiği simptomlar **b)** PMMoV'in varlığının moleküler olarak karakterizasyonu



Şekil 4.4. 01.07.18-25.10.18 tarihleri arasında kurulan denemeye ait görüntüler;
a) PMMoV-Kum izolatının mekanik inokulasyon sonrasında meydana getirdiği simptomlar **b)** PMMoV'in varlığının moleküler olarak karakterizasyonu



Şekil 4.5. 02.11.19-30.03.19 tarihleri arasında kurulan denemeye ait görüntüler;
a) PMMoV-Kum izolatının mekanik inokulasyon sonrasında meydana getirdiği simptomlar **b)** PMMoV'nin varlığının moleküler olarak karakterizasyonu

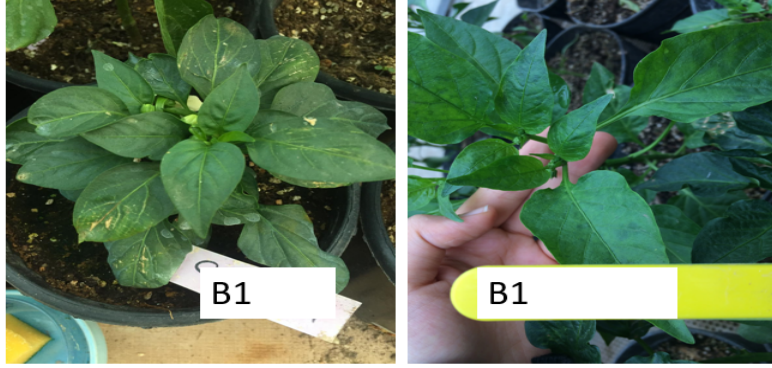
4.2. *L4* Geninin Varlığını Moleküler Markırlar Kullanılarak Belirlenmesi

Bilindiği üzere *Tobamovirus*lere karşı hastalık dayanıklılıkları için *L1*, *L2*, *L3*, *L4* genleri kullanılmaktadır. Bu genler bitkiler üzerinde HR reaksiyonları sayesinde enfeksiyonların gelişmesine imkan sağlamamaktadır (Boukema 1982; Rast 1982). PMMoV dayanıklılığı için ise *L3* geni *Capsicum chinense*, *L4* geni ise *Capsicum chacoense* biber genotipleri kullanılmaktadır. Ülkemizde Çağlar ve Fidan'ın (2012) gerçekleştirdikleri çalışmada biber üretim alanlarında *L3* geni vasıtasıyla sağlanan dayanıklılığın kırıldığına ait raporlar mevcut iken *L4* dayanıklılığının durumunu inceleyen bir çalışma henüz gerçekleştirilmemiştir. Bu nedenle ülkemizde *L4* geninin PMMoV enfeksiyonlarına karşı dayanıklılığını en iyi şekilde yorumlamak amacıyla

yayınlanmış 5 adet primer çifti kullanılarak test bitkileri moleküler analizlere tabi tutulmuştur.

4.3. Bitkilerin Mekanik İnokulasyon Sonrası Gözlenen Simptomlar

Bitkilere uygulanan mekanik inokulasyon sonrasında ilk belirtiler hassas çeşit olarak seçilen B1 bitkisi üzerinde 15-20 gün içerisinde gözlemlenmiştir. B1 olarak seçilen hassas çeşit üzerindeki belirtiler Şekil 4.6’da paylaşılmıştır.



Şekil 4.6. B1 bitkisinde meydana gelen belirtiler

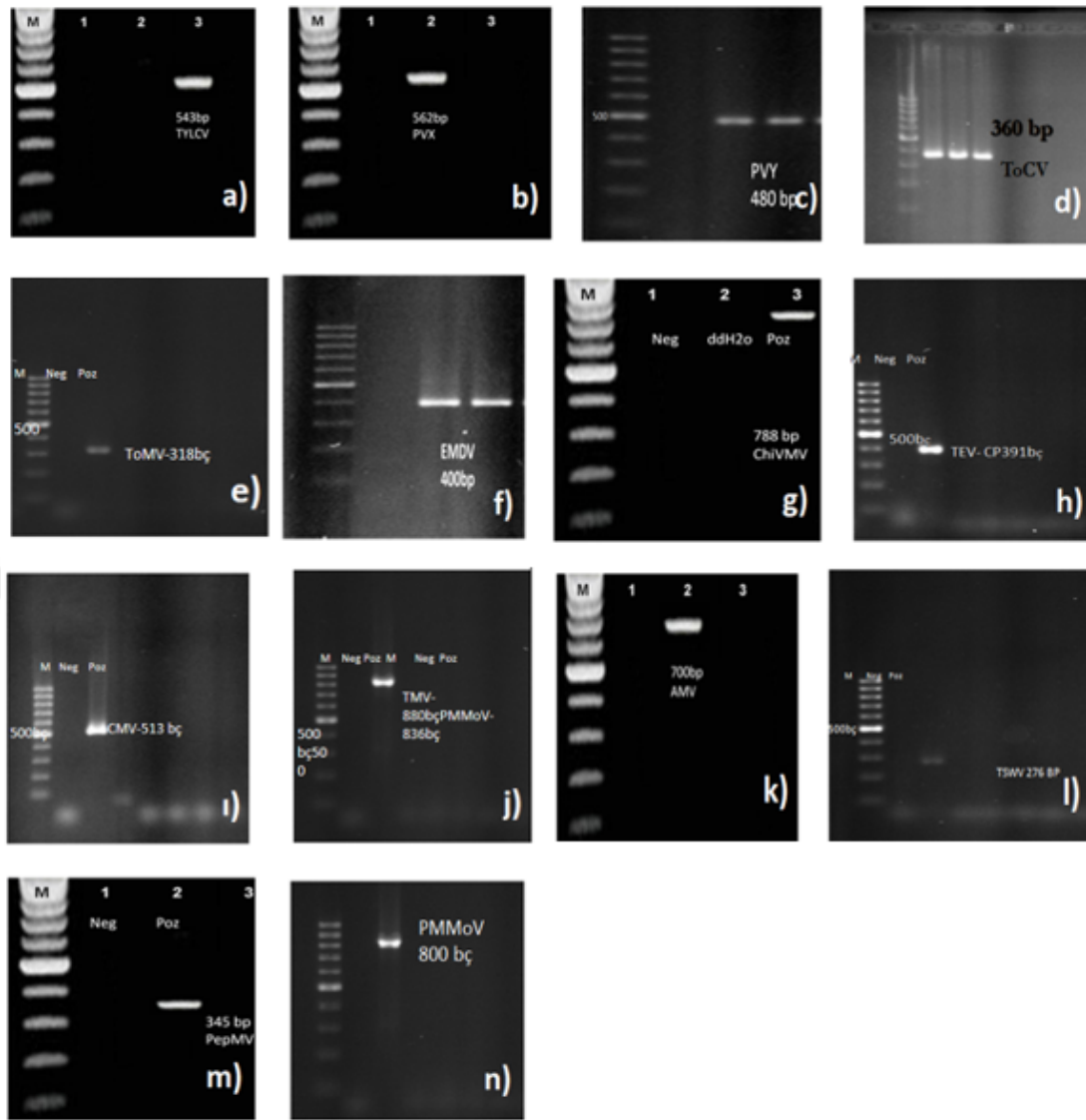
B1 bitkisi üzerinde PMMoV ait belirtiler gözlemlenirken diğer test bitkilerinde herhangi bir belirtiye rastlanmamıştır. L4B2, L4B3, L4B4, L4B5 bitkilerinin 15-20 gün sonrasındaki görüntüleri Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. L4B2, L4B3, L4B4, L4B5, L4B6 bitkilerinin 15-20 gün sonraki durumları

Tüm test bitkileri üzerinde PMMoV'de dahil olmak üzere biber bitkileri üzerinde en sık rastlanan virüslerin varlığının belirlenmesi için RT-PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Test bitkilerinin RT-PCR sonuçları Şekil 4.8.'de paylaşılmıştır. RT-PCR sonuçları doğrultusunda sadece hassas çeşit olan B1 bitkilerinin PMMoV enfeksiyonu RT-PCR çalışmaları ile doğrulanmıştır. Diğer virüsler için RT-PCR çalışmalarında tüm test bitkileri için negatif sonuç alınmıştır.

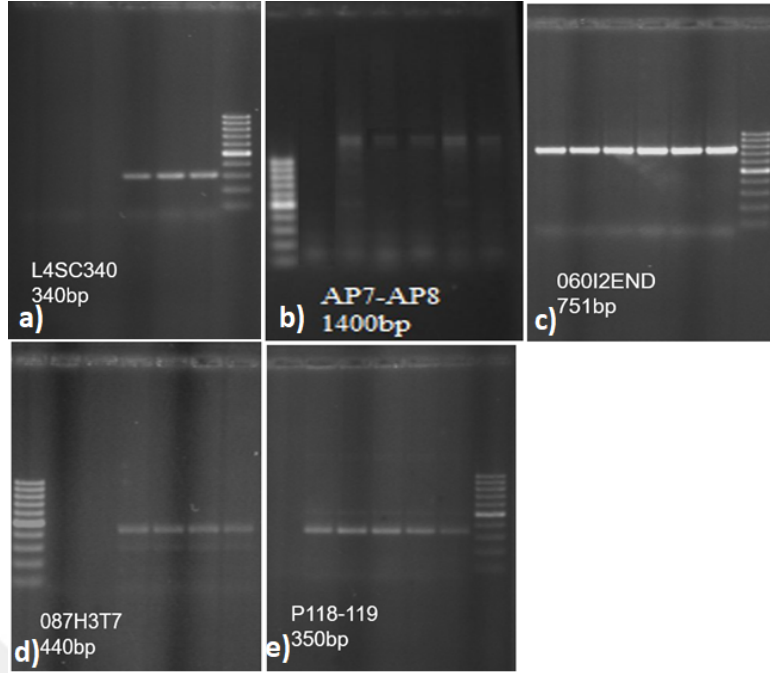
Yaptığımız tez kapsamında bitkilerde *L4* gen aktivitesini belirlemeye yönelik 5 adet primer çifti için PCR çalışması yapılmış, dayanıklılığın durumunu belirleyebilmek için PMMoV mekanik olarak bulaştırılmış, virüslerin varlığını tespit etmek için RT-PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Tüm bu işlem basamakları geçildikten sonra sıra fenotipik ve genotipik verilerin birlikte yorumlanması aşamasına gelinmiştir. Çizelge 4.2'de 6 adet biber çeşidinin 5 farklı primer kombinasyonuna ait PCR çalışması sonuçları paylaşılmıştır. Şekil 4.9'da *L4* markırlarının (L4SC340,AP-7/AP-8, 060I2END, 087H3T7, P118/P119)'nin sonuçları paylaşılmıştır.



Şekil 4.8. Tüm test bitkilerine ait RT-PCR analizine ait jel görüntüleri; **a)** TYLCV ait bant görüntüsü; **b)** PVX'e ait bant görüntüsü; **c)** PVY'e ait bant görüntüsü, **d)** ToCV'a ait jel görüntüsü; **e)** ToMV'e ait jel görüntüsü; **f)** EMDV'e ait jel görüntüsü; **g)** ChiVMV'e ait jel görüntüsü; **h)** TEV'e ait jel görüntüsü; **ı)** CMV'e ait jel görüntüsü; **j)** TMV'e ait jel görüntüsü; **k)** AMV'e ait jel görüntüsü; **l)** TSWV'e ait jel görüntüsü; **m)** PepMV'e ait jel görüntüsü; **n)** PMMoV'e ait jel görüntüsü

Çizelge 4.2. adet biber çeşidinin 5 farklı primer kombinasyonuna ait PCR çalışması sonuçları. (+) *L4* var, (-) *L4* yok.

Primer / Biber Çeşidi	B1	L4B2	L4B3	L4B4	L4B5	L4B6
L4SC340	-	-	-	+	+	+
AP-7/AP-8	-	+	+	+	+	+
060I2END	+	+	+	+	+	+
087H3T7	-	-	+	+	+	+
P118/P119	-	+	+	+	+	+



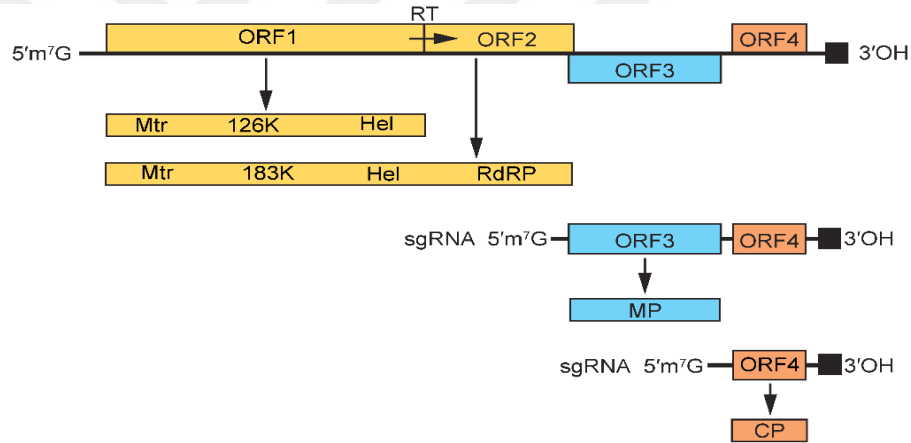
Şekil 4.9. L4 primerlerine ait jel görüntüleri, **a)** L4SC340 primerine ait jel görüntüsü, **b)** AP7-AP8 primerine ait jel görüntüleri, **c)** 060I2END primerine ait jel görüntüsü, **d)** 087H3T7 primerine ait jel görüntüsü, **e)** P118-P119 primerlerine ait jel görüntüsü.

Tez çalışması boyunca elde etmeyi istediğimiz en önemli verilerden biri *L4* geninin varlığını en doğru şekilde bize sunan moleküler markırları belirleyebilmektir. Bu verilerin elde edilmesi hem *L4* geni kullanılarak yürütülen dayanıklılık ıslahı çalışmalarında araştırmacılara büyük kolaylık sağlayacak hem de *L4* genin dayanıklılık aktivitesinin belirlenmesinde en doğru sonuçları bizlere sunarak akıllardaki soru işaretlerini azaltmaya yönelik bir adım olacaktır. Bu amaç için *L4* geni içeren ve içermeyen bitkilerin PMMoV'ye karşı gösterdikleri tepkiler belirlenmiştir. *L4* geni içeren bitkiler PMMoV enfeksiyonlarına HR yanıtları ile karşı koyarak enfeksiyonu önlemesi bu genin aktivitesinin hala sağlandığını bizlere göstermiştir. L4B2, L4B3, L4B4, L4B5 bitkileri üzerinde herhangi bir PMMoV enfeksiyonu meydana gelmediği hem gözlemlerle hem de RT-PCR sonuçları ile doğrulanmıştır. B1 bitkisinde ise PMMoV enfeksiyonuna ait belirtiler hem gözle görülür şekilde fark edilmiş hem de RT-PCR sonuçları ile bu belirtilerin sadece PMMoV ait olduğunu doğrular nitelikte olmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda moleküler markırlarında L4B2, L4B3, L4B4, L4B5 bitkilerinin *L4* genini içerdiği B1 bitkilerinin ise *L4* geninden yoksun olduğu sonucunun elde edilmesi gerekmektedir. *L4* geni için denenen 5 primer çiftinden sadece P118/P119 ve AP-7/AP-8 primer çiftleri elde ettiğimiz fenotip sonuçları ile birebir uyduğu sonucuna varılmıştır. *L4* geni bulunmayan B1 çeşidinde, 060I2END primerine göre pozitif sonuç vermesinin yanıltıcı olabileceği belirlenmiştir. Ayrıca *L4* geni bulunduğu emin olduğumuz L4B2 ve L4B3 çeşitleri içinde, L4SC340 primerine göre negatif sonuç verip, AP-7/AP-8 primerine göre pozitif sonuç vermesi de bu iki primerin birbirleri ile tutarlı sonuçlar vermediği dolayısıyla da anlam karmaşasına yol açabileceği düşünülmektedir.

Özellikle biber ıslahı üzerinde çalışan firmaların *L4* dayanımı üzerinde daha hassas sonuçlar veren markırlar üzerinde yoğunlaşmaları gerekmektedir. Çizelge 4.2'deki veriler incelendiğinde *L4* markırlarının birbirinden uyumsuz sonuç vermesi bu markırların herhangi birini kullanarak devam eden çalışmalarda yanlış sonuçlar vermesine neden olabilmektedir. Bu problemde aslında *L4* geni içermediği halde var olduğuna dair bilgiler vermesi araştırmacıları yanlış sonuçlara yönleltmektedir. Yaptığımız tez çalışması ile *L4* geninin hala PMMoV için en güvenilir dayanıklılık kaynağı olduğu doğrulanmıştır. *L4* geninin dayanıklılığına ait şüphelerin bu geni belirlemeye yönelik kullanılan primerlerin birbirleri ile tutarlı olmayan sonuçların neden olabileceği düşünülmektedir. Bu tez çalışması kapsamında hem bu şüphelerin ortadan kalkması sağlanmıştır hem de en doğru primer kombinasyonun tespiti yapılarak araştırmacıları doğru hedeflere ulaştırılmaya çalışılmıştır.

4.4. PMMoV-Kumluca İzolatına Ait Filogenetik Analizler

PMMoV genomu Şekil 4.10'da gösterildiği gibi bir hareket proteini (Movement Protein), bir kılıf proteini (Coat Protein) ve iki alt ünite şeklinde bir replikaz genomu (183 kDa ve 126 kDa)'dan oluşmaktadır.



Şekil 4.10. PMMoV'nin dahil olduğu *Tobamovirus*lerin genom yapısı (ICTV-Viral Genome)

Tez çalışması boyunca kullanılan PMMoV-Kumluca izolatının *L4* gen aktivitesini kırmadığı tespit edilmiştir. Bu izolat Buzkan ve Yüzer (2009)'ingeliştirdiği primerler kullanılarak RT-PCR çalışmaları ile PMMoV'ye ait olduğu doğrulanmıştır. Bu izolatın evrimsel ilişkileri hakkında yorumlarda bulunmak ve göç haritası hakkında ipuçları alabilmek için sekans hizmetleri alınmış ve filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir. Sekans hizmetleri sonucunda 793 bp uzunluğunda PMMoV'ye ait genom parçası elde edilmiştir. Bu genom parçası NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanı kullanılarak Blast Analizi (Sekans bazında arama) yapılarak genom verileri ve bu verilere ait bilgiler çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

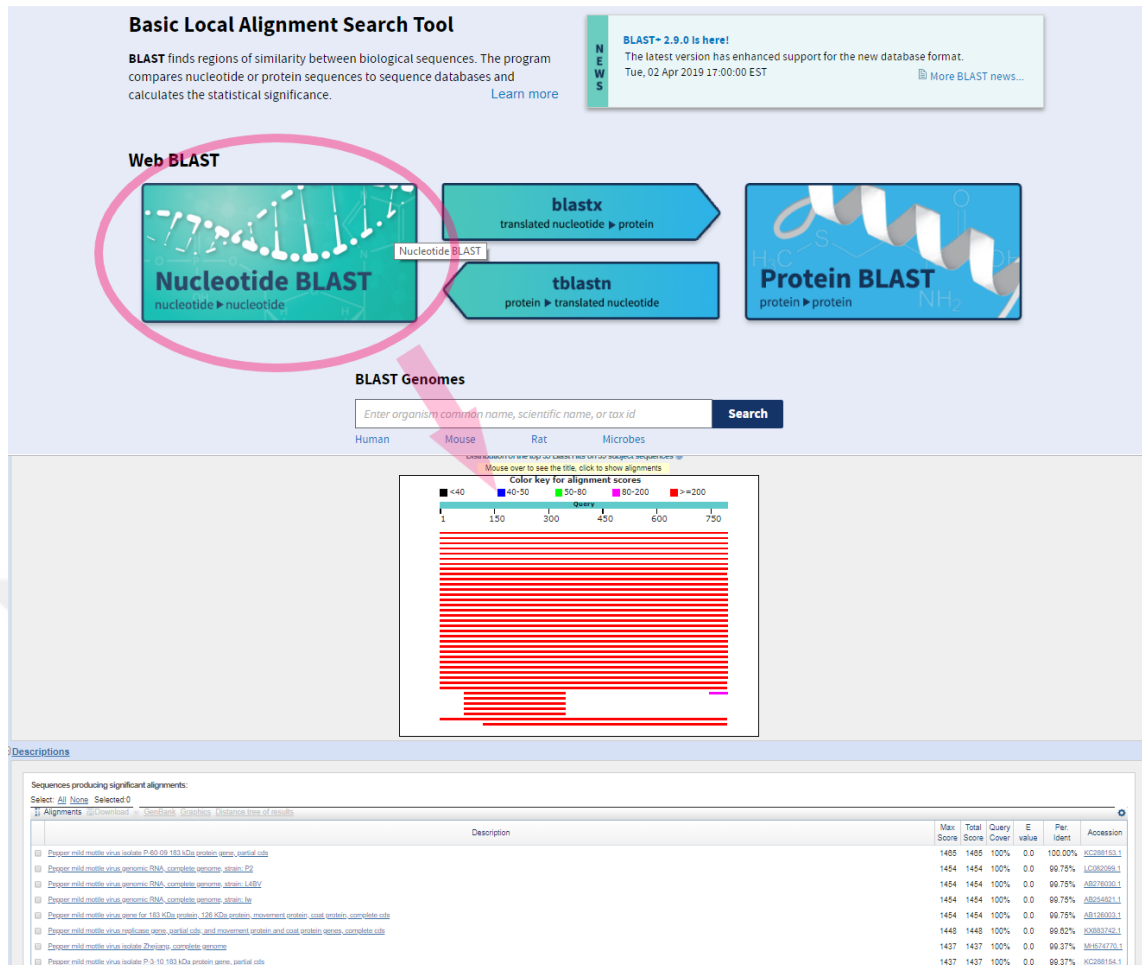
>PMMoV-Kumluca (MK806437)

CAAAGTGAATACCCGGCTTTGCAAAGTATTGTGTATCATAGCAAGAAAATCAA
 TGCGCTTTTTTGGTCCTGTATTTTCAGAATTAACAAGACAAGTCTAGAGTCAA
 TTGACAGTTTCGAGATTCATGTTTTATACAAGGAAAACGCCTACACAGATCGA
 AGAGTTTTTTCAGATCTGGACTCTAATGTTTCCTATGGACATATTAGAGCTGGACAT
 TTCCAAGTATGACAAATCACAGAACGAATTTTCATTGTGCAGTTGAGTATGAGA
 TTTGGAAAAGGTTAGGCTTAGACGATTTCTTGGCCGAAGTTTGGAAACACGG
 GCATCGGAAGACAACGTTGAAAGACTACACAGCCGGAATAAAAACGTGTTT
 GTGGTATCAAAGGAAAAGTGGTGATGTCACCACATTCATTGGAAACACGATC
 ATTATTGCTGCATGTCTGTCCTCTATGCTACCGATGGAGAGATTGATTAAAGGT
 GCCTTTTGTGGTGATGATAGTATACTATACTTTCCAAAGGGCACTGATTTCCT
 GATATTCAACAGGGTGCAAATCTTCTCTGGAATTTTGAAGCCAAGTTGTTTAG
 GAAGAGATATGGTTACTTTTGCGGTAGGTACATAATCCACCATGACAGAGGTT
 GTATTGTATATTATGACCCTCTAAAATTGATCTCGAAACTCGGTGCTAAACACA
 TCAAGAATAGAGAACATTTAGAGGAATTTAGGACCTCTCTTTGTGATGTTGCT
 GGGTCGTTGAACAATTGTGCGTACTATACACATTTGGACGACGCTGTCTG

Çizelge 4.3. PMMoV sekansına ait bilgiler

Bölge	4015...4807
Toplam büyüklük	793 bp
ORF	RdRp (183 kDa alt ünitesi)
Toplayan	Murat BARUT
Tanımlayan	Hakan FİDAN
Konukçu	<i>Capsicum annuum</i>

PMMoV-Kumluca izoaltına ait sekans uzunluğunun genomun hangi parçasına ait olduğu araştırılmıştır. Şekil 4.11’de PMMoV-Kumluca izolatının BLAST Analizine ait görüntüler paylaşılmıştır. PMMoV genom büyüklüğü yaklaşık olarak 6.3-6.5 kb arasında değişmektedir. Blast analizi sonucunda PMMoV-Kumluca izolatının genomun 4015. noktasından başladığı ve 4807. noktasında sonlandığı belirlenmiştir.



Şekil 4.11. PMMoV-Kumluca izolatının BLAST Analiz sonuçları

Şekil 4.11’de gösterildiği gibi BLAST Analizi sonucunda benzerlik oranı en yüksek (%100) olarak Sırbistan izolatu (KC288153.1) ile kurduğu belirlenmiştir. BLAST Analizinin bizlere verdiği 39 benzer izolattan ağırlıklı olarak biber konukçusu olmasına dikkat edilerek dünyanın farklı bölgelerinden elde edilen izolatlar veri sisteminden alınarak filogenetik analizlerde kullanılmıştır. Filogenetik analizler için kullanılan izolatlara ait bilgiler Çizelge 4.4’de paylaşılmıştır.

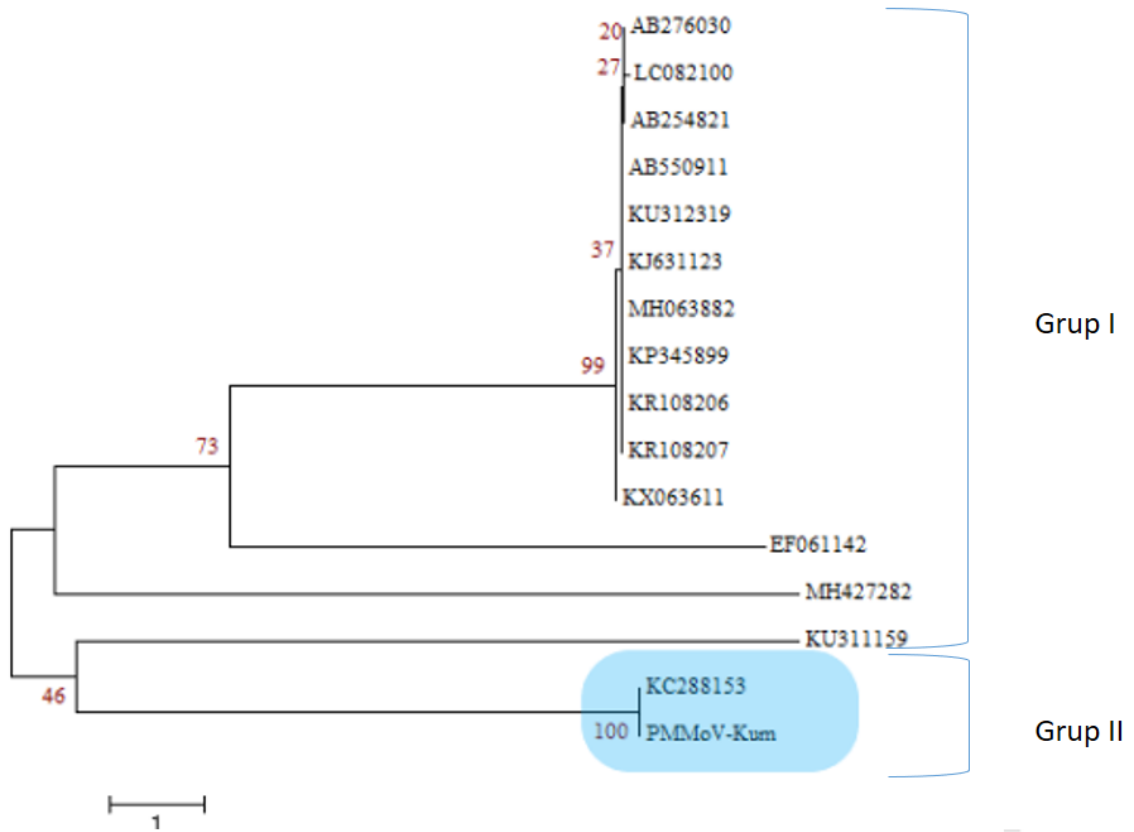
Çizelge 4.4’de gösterilen izolatları MEGA-7 programı Komşu Birleştirme Yöntemi (Neighbor-Joining) kullanılarak Şekil 4.12’de gösterilen filogenetik analiz gerçekleştirilmiştir. PMMoV-Kumluca izolatının filogenetik analizi için Türkiye, Sırbistan, Japonya, Çin, Kanada, Güney Kore, Brezilya, Tunus, Amerika Birleşik Devletleri, Hindistan, İspanya, Venezuela, Avustralya’nın dahil olduğu 13 ülke filogenetik analize dahil edilmiştir.

Çizelge 4.4. Filogenetik Analizler için kullanılan izolatlara ait bilgiler

Sıra	NCBI numarası	İzolat ismi	Strain	Ülke	Konukçu	Benzerlik oranları
1	MK806437	PMMoV-Kum		Türkiye	<i>Capsicum annuum</i>	
2	KC288153	P-60-09		Sırbistan	<i>Capsicum annuum</i>	L3 dayanımı var 100.00
3	AB276030		L4BV	Japonya: Hokkaido	Yeşil biber	L4 dayanımının 1 kırıan 99.75
4	AB254821		pathotype P1,2	Japonya		L3 dayanımının 1 kırıan 99.75
5	KP345899	HN1		Çin	<i>Capsicum annuum</i>	97.60
6	KU311159	PMMVOU2		Kanada		99.12
7	KR108206	RP		Güney Kore: Dangjin	<i>Rorippa palustris</i>	P2 izolatı 97.73
8	AB550911		BR-DF01	Brezilya: Brasilia		L3 dayanımı var 97.73
9	KR108207	LS		Güney Kore: Dangji	<i>Leonurus sibiricus</i>	97.60
10	EF061142	Tun-12		Tunus	Biber	L3 dayanımı var 97.60
11	MH063882	BL14		Amerika Birleşik Devletleri	Şili biber	97.23
12	KJ631123	HP1		Hindistan	<i>Capsicum annuum</i>	L3 dayanımı var 97.23
13	LC082100	PMMoV-KP3	P3	Güney Kore	Acı biber	L3 dayanımının 1 kırıan 94.18
14	KX063611	pMG	P1,2	İspanya	Biber	L3 dayanımı var 97.73
15	KU312319	VE		Venezuela		97.35
16	MH427282	PMMoV-QLD		Avustralya: Queensland	<i>Apis mellifera</i>	97.35

Filogenetik analiz oluşturulurken dikkat edilen bir diğer önemli unsur ise konukçu aralığı olmuştur. Filogenetik analize dahil edilen 16 izolatın konukçuları incelendiğinde 9 tanesi biber, 3 tanesi ise yabancı otlardan oluşmaktadır. Filogenetik analizlerde kullanılan izolatların yakınlık-uzaklıkları MEGA-7 programı ile hesaplanmış ve Çizelge 4.5'te

paylaşmıştır.



Şekil 4.12. PMMoV-Kumluca izolatına ait filogenetik analizler

Filogenetik ağaca ait veriler incelendiğinde PMMoV'e ait izolatların iki ana gruba bağlı olarak dallandığı görülmektedir. I. grup olarak nitelendirilen kümede genel olarak *L4* ve *L3* dayanımını kıran P1.2.3. ve P1.2.3.4 izolatların var olduğu görülmekte iken ülkemizin Antalya-Kumluca bölgesinden elde edilen PMMoV-Kum izolatında dahil olduğu II. grupA ait olduğu belirlenmiştir.

2016-2017 yılında Antalya-Kumluca bölgesinden elde edilen izolatların Grup II'de yer alması bu izolatın *L4* dayanımını kıran bir patotipe ait olmadığını göstermektedir. Filogenetik ağaç verileri oluşturulurken PMMoV'nin replikaz bölgesine

ait olan sekans verileri kullanılmıştır. Svoboda vd. (2002), Ruiz vd. (2016), Deri vd. (2018), Genda vd.(2007), Choi vd. (2016), Antignus vd. (2008)'nın çalışmalarında belirttiği gibi eğer patotip tayini üzerinde bir çalışma yapılacak ise bu çalışmanın PMMoV'nin kılıf proteini üzerindeki mutasyon bölgeleri baz alınarak yürütülmesi gerekmektedir. Genel hatları ile incelendiğinde PMMoV-Kum izolatının filogenetik verileri ile fenotipik ve genotipik yanıtları birleştirildiğinde *L4* dayanımını kıran bir patotipe ait olmadığı belirlenmiştir. 2016-2017 yılında biber üretim alanlarının PMMoV ile yoğun olarak bulaşık bulunmasının ıslah çalışmalarında öncülük edecek olan moleküler markırların birbirleri ile çelişkili sonuçlar içerebilecek olduğu düşüncesidir.

Çizelge 4.5. Filogenetik analizlerde kullanılan izolatların birbirlerine uzaklık-yakınlığına ait verileri

PMMoV-Kum																
KC288153	0,00															
AB276030	12,87	12,87														
AB254821	12,86	12,86	0,01													
KU311159	13,58	13,58	14,03	14,02												
KX063611	13,04	13,04	0,03	0,03	14,45											
KR108206	13,35	13,35	0,04	0,03	14,44	0,01										
AB550911	13,35	13,35	0,04	0,03	14,45	0,02	0,02									
KR108207	13,36	13,36	0,03	0,03	14,44	0,01	0,00	0,01								
KP345899	13,36	13,36	0,03	0,03	14,44	0,01	0,01	0,01	0,00							
EF061142	14,42	14,42	9,91	9,91	20,17	9,71	9,71	9,72	9,71	9,71						
KU312319	13,36	13,36	0,03	0,03	14,45	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	9,71					
MH063882	13,36	13,36	0,03	0,03	14,45	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	9,71	0,00				
KJ631123	13,37	13,37	0,04	0,03	14,45	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	9,72	0,00	0,01			
LC082100	12,68	12,68	0,05	0,06	13,86	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	10,15	0,08	0,07	0,08		
MH427282	13,97	13,97	14,13	14,15	17,59	13,70	14,01	14,01	14,01	14,01	13,50	14,01	14,01	14,01	14,01	14,29

5. TARTIŞMA

Tohumla ve mekanik olarak kolaylıkla taşınabilen *Tobamovirus*ler biber yetiştiriciliği yapılan alanlarda her dönem için bir tehdit unsuru olarak karşımıza çıkmaktadır. PMMoV son yıllarda biber üretim alanlarında büyük problemler oluşturmaktadır. Özellikle Çağlar ve Fidan tarafından 2012 yılında yaptıkları çalışmada *L3* geni vasıtasıyla PMMoV için sağlanan dayanıklılığın kırılmasının rapor edilmesiyle birlikte bu hastalık ile mücadelede kullanılacak tek dayanıklılık kaynağı olarak *Capsicum chacoense*'den elde edilen *L4* geni üzerinden çalışmalara devam edilmiştir.

L4 geni vasıtasıyla sadece PMMoV'ye karşı değil aynı zamanda *Tobamovirus* grubuna ait ToMV, TMV gibi diğer virüslere karşıda dayanıklılık sağlanabildiği belirtilmiştir (Boukema vd.1984). *L4* gen aktivitesinin kırılmış olma ihtimali bu virüslere karşı elimizdeki en güçlü silahımızı kaybedebileceğimiz anlamına gelmektedir. Bu yüzden *L4* gen aktivitesini belirlemeye yönelik en başarılı moleküler markırın tespit edilmesi, PMMoV'nin bitkiler üzerinde oluşturdıkları reaksiyonlar ile birlikte değerlendirilmesi *L4* geninden sağlanan dayanıklılığın kırılıp kırılmadığı konusundaki şüpheleri aydınlatmanın en önemli adımını oluşturmaktadır. Yaptığımız çalışmalarda en başarılı *L4* markır olarak P118/P119 ve AP-7/AP-8 olarak belirlenmiş ve *L4* geninin dayanımının hala başarılı bir şekilde devam ettirdiğini tespit etmiş durumdayız. Diğer önemli bir konu ise neden *L4* geni kırılmadığı halde arazi sörveylerinde biber bitkileri üzerinde PMMoV reaksiyonu meydana geldiği konusudur. Her ıslah firması elde etmek istediği verilerin başında moleküler markır destekli seleksiyon yöntemlerini başarılı bir şekilde kullanarak ismine doğru çeşitlerin piyasaya sürülmesini sağlamaktır. Tez çalışmamızda yayınlanmış olan 5 primerin (*L4SC340*, *AP-7/AP-8*, *060I2END*, *087H3T7*, *P118/P119*) *L4* geninin tespitinde, en yüksek başarıyı hangi primer ile elde edilebileceğinin ortaya koyulması amaçlanmıştır. Yürütmüş olduğumuz çalışmada *L4* dayanımının kırılıp kırılmadığının cevabını moleküler markırların seleksiyon başarısının bizleri doğru sonuca ulaştıracağını düşündüğümüz için bu cevap bizlerin en önemli verisini oluşturmuştur. Bu tez çalışması boyunca kullanılmış olan beş primer moleküler analizler neticesinde birbirleri ile tutarsız cevaplar vermesi *L4* dayanımının doğru bir şekilde bitkilerde tespitini zorlaştıran unsurlardan biri olmuştur. *L4* markırları arasındaki bu tutarsızlıkların firmaları yanılgıya düşürebilecek bir veri olduğu kanaatindeyiz. Denememizde kullandığımız B1 çeşidi hassas çeşidi oluşturmaktadır ve PMMoV ile enfekte olabilmektedir. *060I2END* primerini kullanarak yapmış olduğumuz denemelerde bu markır bizlere *L4* geni için pozitif sonuç vermesi markırın seleksiyonda başarı oranının düşük olduğu düşüncesini oluşturmuştur. Denemede kullanılan *L4B2* bitkisi ise *L4* geni içerdiği üretici firma tarafından beyan edilen ve yaptığımız çalışma neticesinde PMMoV ile enfekte olmayan bir çeşittir. *LSC340*, *087H3T7* markırları ise *L4B2* çeşidinde *L4* geni bulunmasına rağmen, *L4* geni için negatif sonuç vermesi başarı parametresini etkileyen bir diğer verimizi oluşturmaktadır. Elde edilen bu bulgular, *L4* geninin kırılıp kırılmadığı tartışmasına verilebilecek cevabı bizlere sunmaktadır. Başarı oranı düşük olan markırların kullanılması *L4* gen varlığının bitkilerde yanlış

belirlenmesine, dolayısıyla *L4* geni bulunmayan çeşitlerin arazi denemelerinde, PMMoV ile bulaşık duruma gelmesi sonucunu doğurmuştur. Yanlış primer kullanımının ülkemiz için; emek, zaman ve kaynak israfına yol açtığını unutmamak gerekir. Bu primerlerin birbirleri ile neden tutarlı cevaplar vermediğinin irdelenmesi de başka bir çalışma ile aydınlatılması gerekmektedir.

Moleküler markırların başarısını etkileyen unsurlardan biri de bu primerlerin aday gen olan *L4* genine ne kadar yakınlıkta konumlandığı bilgisidir. Denemede kullanılan L4SC340 *L4* genine 1.8 cM yakınında konumlandığı (Kim vd. 2008), AP-7/AP-8 primerlerinin *L4* genine olan yakınlığının 1.5 cM yakınında olduğu (Matsunaga vd. 2009), 087H3T7 primerinin ise gene olan uzaklığının 0.7 cM yakınında konumlandığı rapor edilmiştir (Yang vd. 2009). Bu araştırmacıların verileri dikkate alındığında en başarılı primerin Yang vd. (2009) yılında geliştirdikleri 087H3T7 primeri olması beklenmektedir. Buna karşılık kurmuş olduğumuz beş deneme ve bitkilerin PMMoV ile bulaşık olma durumları değerlendirildiğinde en başarılı primerin Matsunaga vd. (2009)'da geliştirdikleri AP-7/AP-8 primeri olduğu belirlenmiştir. 087H3T7 primerinin kurmuş olduğumuz denemelerde L4B2 bitkisinde herhangi bir PMMoV enfeksiyonuna rastlamadığı ve AP-7/AP-8, 0602I2END, P118/P119 primerleri ile *L4* geninin varlığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar birleştirildiğinde 087H3T7 primerinin başarı oranını düşüren bir parametre olduğu kanısına varılmaktadır. Daha geniş populasyon aralığında bu primerlerin başarı oranlarının irdelenmesi araştırmacıların doğru sonuçlara ulaşması için atılacak önemli bir adımdır. Ayrıca Yang vd. (2009) *L3* ve *L4* markırları arasındaki genetik uzaklığın *C. annuum*/*C. chinense* veya *C. annuum*/*C. chacoense* arasında meydana gelen melezler arasında farklılıklar gösterebileceğini belirtmişlerdir. Melezler arasındaki farklılıkların bu genlerin çalışma aktivitelerinde herhangi bir farklılık meydana getirip getirmediğinin belirlenmesi gerekmektedir.

L genleri için farklı sıcaklıklara bağlı aleller L1a, L1c ve L2b, *C. annuum* cv. KC780, *C. chinense* KC667 ve *C. baccatum* PI 439381-1-3 üzerinde tanımlanmıştır (Tomita vd. 2011). *L4* gen aktivitesinin farklı sıcaklıklar gibi değişik çevre etmenleri tarafından etkilenip etkilenmediğinin belirlenmesi amacıyla tez çalışmamız, biyolojik test kısmı bir yılın tüm zaman dilimine dağıtılarak ve farklı ortamlar (sera ve iklimlendirme) baz alınarak planlanmıştır. Bu planlamanın amacı sıcaklık etkilerinin monogenik dominant gen olarak belirtilen (Boukema 1983; Van Duin 1998) *L4* geninin sıcaklığa bağlı olarak gösterdiği davranışların belirlenmesi ve son yıllarda Antalya'daki biber üretim alanlarında neden olan PMMoV enfeksiyonlarında sıcaklık faktörünün *L4* genine bağlı olarak davranışındaki etkilerindeki payının belirlenmesidir. Bir yıl boyunca farklı mevsimlerde planlamış olduğumuz biyolojik test sonuçlarında L4B2, L4B3, L4B4, L4B5, L4B6 bitkilerinde herhangi bir semptomun oluşmaması hem makroskobik gözlemlerle hem de moleküler yöntemler ile belirlenmiştir. Bu veriler birleştirildiğinde PMMoV-Kum izolatının epidemilerinde sıcaklık etmeninin önemi olmadığı belirlenmiştir.

PMMoV enfeksiyonları ile son yıllarda daha fazla karşılaşılması diğer bir merak konusudur. Bazı virüsler bitkilerde bulaşık olsa bile belirtileri çok geç farkedilebilmektedir. PMMoV'nin bitkiler üzerindeki belirtileri bitkilerin yetiştirildiği ortam koşullarına (sıcaklık, nem vb.), bitkinin yaşına ve daha birçok neden bağlı olarak değişebilmektedir. Denememizde kullandığımız hassas çeşidimiz B1 üzerinde belirtilerinde dalgalanmalar meydana geldiği belirlenmiştir. Bu bitkiler üzerindeki belirtiler bazı bitkilerde yaprak belirtisi olarak meydana gelse de tüm hassas bitkiler üzerinde belirgin belirtiler saptanmamıştır. Bulaştırmadan 20 gün sonra yapılan RT-PCR yöntemi ile virüs varlığının belirlenmesi hassas çeşide ait tüm bireylerin PMMoV ile enfekteli olduğu sonucunu bize vermiştir. RT-PCR sonuçlarına göre pozitif olan bitkiler meyve dönemine kadar herhangi bir belirti ifadesi sergilememiştir. Bu sonuç bizleri PMMoV'nin uzun bir dönem bitki içerisinde gizli kalabildiği tam meyve dönemine geçildiğinde ortaya çıkarak zararlar meydana getirebileceği kanısına ulaştırmıştır. Petrov (2014) yaptığı çalışmada PMMoV'nin bitkiler meyve dönemine geçinceye kadar herhangi bir belirti vermediğini hasat zamanı geldiğinde ise büyük verim kayıplarına neden olduğunu belirtmiştir. Bizim de benzer sonuçlar elde etmemiz özellikle hasat zamanına kadar gizli kalması bu alanda tarım alet ve ekipmanlarının dezenfeksiyonun göz ardı edilmesine ve ilerleyen zamanlarda daha büyük zararlar şeklinde karşımıza çıkacağı sonucuna ulaştırmıştır.

PMMoV gibi virüs hastalıklarının konukçu aralığının belirlenmesi bu hastalığın epidemiyolojisinin yorumlanmasında bize bilgiler verebilecek çalışmalardır. Kwon ve ark (2015) biber üretim alanları ve çevresinden elde ettikleri örneklerde PMMoV benzeri belirtiler belirlemişlerdir. Bu üretim alanlarına yakın bölgelerde kendine yaşam alanı bulan *Rorippa palustris* yabancı ot üzerinde de virüs benzeri belirtilerin bulunması bu araştırmacıları bitkinin PMMoV konukçuluk etmedeki payının belirlenmesi gerekliliğini ortaya koymuştur. Yaptıkları çalışmalarında *Rorippa palustris* PMMoV'ye konukçuluk eden bir yabancı ot olduğu ve ortamda biber bitkileri yok iken bu virüs hastalıklarının farklı konukçular üzerinde yaşamlarına devam ettiği ve biber üretim dönemine geçildiğinde ise asıl zararlarını gerçekleştirerek verim kayıplarına neden olabileceği sonucunu bize vermiştir. Özellikle biber alanlarında kendilerine yaşam alanı bulan yabancı otların hangilerinin PMMoV'ye konukçuluk yaptığının belirlenmesi ve bu bitkilerin ortamdaki uzaklaştırılması PMMoV ile mücadelede atılabilecek önemli bir adımdır. Virüslerin konukçu aralıkları onlara taşınması ve hayatta kalması için bir fırsat sunar. Virüslerin üretim alanlarında yabancı ot gibi konukçu aralığının daraltılması onların enfeksiyon meydana getirme şansını ellerinden almaktadır.

PMMoV'nin biber üretim alanlarında görülme nedenleri arasında toprak dezenfeksiyonunda önemli bir unsurdur. 2009 yılından bu yana metil bromid uygulamalarının çevreye olan zararından dolayı yasaklanması toprak kökenli hastalıklarında artışında incelenen nedenler arasında kendine yer bulmaktadır. PMMoV toprak kökenli bir virüsdür ve toprakta uzun süre kalıcılığı devam etmektedir. Toprakta

kökler geliştikçe açılan küçük yaralardan virüs temas yoluyla bulaşabilmekte ve sistemik enfeksiyonlarına bitkilerde meydana getirebilmektedir(Tosic vd. 1980; Toyoda vd. 2004).

Ülkemizde son yıllarda biber üretim alanlarında problem olan PMMoV patotipinin *L3* genini kıran P1.2.3 patotipi olduğu düşünülmektedir. Çağlar ve Fidan'ın 2012 yılında yaptıkları çalışmalarında *L3* dayanımını kıran izolatin ülkemizde varlığından söz etmişlerdir. Şuanki biber üretim alanlarında *L4* dayanımını kıran izolata rastlanmamıştır. Ama ülkemizde P1, P1.2 patotiplerinin varlığı veya yokluğuna dair bir çalışma da mevcut değildir. Choi vd. (2013;2014) Kore'de gerçekleştirdikleri çalışmalarında P1.2 ve P1.2.3 patotiplerinin bulunabildiğini belirtmişlerdir. Antignus vd. (2008) ise İsrail'de benzer bir çalışma yürüterek P1.2 ve P1.2.3 patotiplerinin varlığını önceden belirlemişlerdir. Arazi surveylerinde PMMoV ile benzer özellikler sergileyen örnekleri toplayıp RT-PCR yöntemi kullanarak PMMoV ile enfekteli olduğunu doğrulamışlardır. Elde edilen kılıf proteininin tüm nükleotid dizilimlerini kullanarak bu protein alanı içerisinde meydana gelen bir mutasyonun P1.2.3.4 patotipini meydana getirdiği sonucuna varmışlardır. Genda vd. (2007) Japonya'da gerçekleştirdikleri çalışmalarında benzer yöntemleri kullanarak PMMoV'in agresiflik derecesi en yüksek patotipi olarak P1.2.3.4 patotipinin varlığını rapor etmişlerdir.

PMMoV-Kum izolatinın bitkiler üzerindeki gözlemleri ve moleküler çalışmaları birleştirildiğinde geriye tartışılması gereken diğer konu bu izolatin dünya izolatları ile arasındaki filogenetik ilişkinin belirlenmesidir. Filogenetik analizler bizlere bir türün evrimsel tarihi hakkında bilgiler sunarken aynı zamanda o izolatin göç haritası hakkında da araştırmacılara ipuçları sunmaktadır. Filoegenetik analizlerin gerçekleştirilmesi için PMMoV-Kum izolatinın sekans bilgileri elde edilmiştir. PMMoV-Kum izolatinın sekans bilgileri replikaz genomunun 183 kDa alanına ait yaklaşık 793 bp uzunluğunda bir alandır. Bu kısa sekans parçası PMMoV-Kum izolatinın BLAST Analizlerinde en yakın ilişkiyi %100 oranında KC288153 izolatu ile kurduğu görülmüştür. KC288153 izolatu 2009 yılında Sırbistandan elde edilen PMMoV'ye ait bir sekanstır (Milosevic vd. 2009). Bu araştırma grubu rapor ettikleri PMMoV sekansının kılıf proteinine özgü bölgeyi amplifiye ederek yaptıkları kıyas analizlerinde bu izolatin *L3* geninin sağladığı dayanımı kıramayan P1.2 patotipine ait olduğunu belirtmişleridir. Svoboda vd. (2002), Ruiz vd. (2016), Deri vd. (2018), Genda vd.(2007), Choi vd. (2016), Antignus vd. (2008)'nın çalışmalarında belirtildiği gibi eğer patotip tayini amacıyla bir çalışma yürütülecek ise PMMoV'nin kılıf proteini üzerindeki mutasyon noktaları baz alınarak incelemelerin yapılması gerekmektedir. PMMoV-Kum izolatinın replikaz genomu baz alınarak yapılan filogenetik analizlerde *L3* ve *L4* dayanımını kıran izolatlardan uzak konumlanması çalışmanın tüm verileriyle örtüşen tamamlayıcı nitelikte bir veridir. Ülkemizde PMMoV'nin patotiplerini nükleotid ve aminoasit bazında belirlemeye yönelik çalışmalarında eş zamanlı olarak yürütülmesi gerekliliğini de aynı zamanda ortaya koymaktadır.

Günümüz teknolojik verileri sayesinde bu izolatlar kolaylıkla Genbanklarına kayıt edilebilmekte ve erişim numaraları kullanarak bu izolatlar nükleotid kıyas analizlerine tabii tutlabilmektedir. Ülkemizde şu ana kadar hangi patotipin yaygın olduğu konusunda bir çalışmanın yapılmamış olması bu konu üzerinde ağırlık verilmesi konusunu ortaya koymaktadır. Ülkemizde Fidan ve Sarı (2019) TSWVAntRB ve Fidan vd. (2019) TSWV-TRPep izolatlarının tüm nükleotid dizilimleri bilim dünyası ile paylaşılarak bölgemizden elde edilen izolat bilgilerinin diğer araştırmacıların kullanım ve inceleme imkanı verilmiştir. PMMoV gibi uzun bir dönem bitki içerisinde sessiz kalan ve hasat zamanı atağa geçen bir virüsün ve ona ait patotiplere sahip olan bir virüsün ülkemizdeki izolatlarının varlığının tespiti edilmesi ve bu virüsün tüm nükleotid dizilimlerinin oluşturulması hem filogenetik çalışmalar için hem de patotiplerin tayini için izlenmesi gereken adımlardan biridir. Araştırmacılar PMMoV'nin patotiplerinin kılıf proteinleri üzerinde meydana gelen mutasyonlar sayesinde farklılaştığı konuları üzerinde durmuşlardır. Kılıf proteini üzerinde protein modellemeleri çalışmaları yapılarak bu noktaların yapısal anlamda herhangi bir farklılık meydana getirip getirmediği konusu incelenmesi gereken konulardan biridir.

PMMoV'nin 2019 yılında ülkemizde *L4* dayanıklılık genini kıran izolatın bulunmaması ve meydana gelen epidemilerde rolünün olmaması ilerleyen dönemlerde karşımıza çıkmayacağı anlamına gelmemektedir. Dünyanın farklı bölgelerinde *L4* genini kıran bu izolatın varlığına dair raporlar mevcuttur. Bu raporların genel özellikleri dünyanın farklı bölgelerinde PMMoV'nin farklı patotiplerinin karşımıza çıkabileceğidir. Bu araştırmalardan elde ettiğimiz sonuç ise okları karantina uygulamalarına çevirmektedir. Biber üretim alanlarının yetiştirilme periyodu boyunca başta TSWV, PVY, CMV, TMV, PMMoV gibi birçok virüs tarafından tehdit altındadır. Özellikle TSWV'nin dayanıklılığı kıran ırkının varlığı yetiştirilme alanlarının büyük bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu hastalık ile mücadelede henüz dünyada bir çalışmanın varlığının söz konusu olmamasından dolayı, yakın gelecekte çözümü olmayan PMMoV'in *L4* genini kıran ırkının ülkemize girmemesi için dikkat edilmesi gereken bir konudur. Bu amaç için karantina uygulamalarına ağırlık verilmeli, toprak ve tohum dezenfeksiyonu her zaman en itinali şekilde yapılmalı ve bitkiler için alternatif yeni dayanıklılık stratejileri geliştirilmeye çalışılmalıdır.

6. SONUÇLAR

Son yıllarda biber üretimalanlarında virüs hastalıklarının görülme insidansında artışlar meydana gelmiştir. Üretim alanlarında kültürel-fiziksel ve kimyasal kontrol yöntemlerinin bilinçsiz yapılması virüslerin ve onlara vektörlük yapan etmenlerin bu alanlara erişimini kolaylaştırmıştır. Bir yandan iklim parametrelerindeki değişimler biryandan da kontrolsüz yapılan yetiştiricilik metodları farklı virüslerin yetiştiricilik alanlarına girebilmesini ve epidemiler meydana getirerek ekonomik anlamda zararların ortaya çıkmasına neden olmuştur. 21. yüzyılda ulaşmayı arzuladığımız nihai hedefler virüslerin tespiti ve kontrolü için bizleri en doğru sonuca götüren yöntemlerin geliştirilmesidir. Son yıllarda Antalya'da özellikle Kumluca ilçesinde biber üretim alanlarında sık rastlanan virüslerden biri olarak karşımıza PMMoV'nin çıkması ve virüsün diğer *Tobamovirüs*ler gibi tohumla taşınması nedeniyle ciddiye alınması gereken bir problem olduğunu bizlere göstermektedir. Bu bağlamda incelenmesi gereken bir diğer konunun PMMoV ile mücadelede *L4* gen aktivitesinin enfeksiyonlara verdiği cevapların nitelendirilmesi gerekliliğidir. Tüm nedenler göz önünde tutulduğunda bu etmenler Türkiye'de PMMoV izolatının Moleküler Karakterizasyonu isimli tez çalışmasının ana rotasını oluşturmuştur.

İlk sonucumuz bölgemizde zarar oluşturan PMMoV-Kum izolatının *L4* genine karşı aktivitesinin yitirip yitirmedığının belirlenmesidir. Bu izolattan, hassas ve *L4* geni ihtiva ettiği bilinen ticari çeşitler üzerinde mekanik inokulasyon işlemleri yapılmıştır. Biyolojik test sonucunda elde ettiğimiz veriler, bu izolata karşı *L4* geninin hala etkili bir gen olduğu sonucunu bizlere vermektedir.

L4 geninin dayanıklılık cevaplarına verdiği yanıtlar değerlendirildiğinde yürüttüğümüz tez planına başka bir parametre dahil olmuştur. *L4* geninine dayanıklılık kırılmadıysa PMMoV probleminin artışında etken olan faktör ne olduğu araştırılmalıdır. Bu sorunun cevabını iki başlık altında incelemek mümkün olmuştur. Bunlardan ilki ıslah firmalarının *L4* geni var olarak beyan ettikleri çeşitlerin etkili moleküler markırlar ile taranmıyor olabilme ihtimalidir. Bu sorunu çözüme kavuşturmak için *L4* geninin belirlemeye yönelik rapor edilen 5 adet moleküler markır teste tabi tutulmuştur. Bu testin sonucunda bazı moleküler markırların yanıltıcı sonuçları bizlere verebilecek olduğu sonucudur. Tez çalışmamız kapsamında biyolojik ve moleküler verilerimizi birleştirdiğimizde Ap-7/Ap-8 ve P118/119 primerlerinin *L4* genini belirleyebilmek için en güvenilir markır olduğu sonucudur. Bu veri bizim en önemli sonuçlarımızdan birini oluşturmaktadır. Moleküler markırlar yardımıyla yürütülen ıslah çalışmalarında en önemli kriter bu kilit noktanın tespit edilmesidir. İkinci etmen olarak PMMoV diğer *Tobamovirüs*ler gibi temas yoluyla bile kolaylıkla bulaşabilmesidir. *Tobamovirüs*ler toprakta uzun süre kalıcılığını sürdürebilmekte ve kökler geliştikçe açılan küçük yaralardan giriş yaparak enfeksiyonlarını meydana getirebilmektedir. Bu konu göz önünde tutulduğunda toprak dezenfeksiyonun önemini artırmaktadır. Özellikle 2009 yılından bu yana toprak dezenfeksiyonlarında tercih edilen Metil bromid'in

yasaklanması ile toprak kökenli patojenlerin oranında artışlar görülmüştür. Alternatif çevre dostu kimyasal uygulamaları belirlense de üreticilerin bu konu hakkında bilinçlendirilmeleri ve bu uygulamaların geliştirilmesi gerekmektedir.

Yaptığımız araştırma sonucuna göre, üretim alanında PMMoV enfeksiyonu bulunan üreticiler, *L4* dayanıklılık geni ihtiva eden ticari biber çeşitlerini dikmesi durumunda, PMMoV ile herhangi bir problem yaşamamayacağı sonucuna varılmaktadır.

Bir başka neden olarak değerlendirebileceğimiz konuda karışık enfeksiyonların bizleri yanlış veriler değerlendirmeye itmesidir. Fidan (2016) elde ettiği verilere dayanarak Antalya bölgesinde Tsw geni ile sağlanan dayanımın kırıldığı ve TSWV'ye ait enfeksiyonların miktarında meydana gelen artışlardır. TSWV ve PMMoV farklı familyalara ait olmalarına rağmen simptomları birbirlerine oldukça benzemektedir. Bu benzerlik kimi zaman biber üretim alanlarında yanıltıcı değerlendirmelere neden olmuştur. Tez çalışması boyunca gerçekleştirilen sörvey ve moleküler analizler neticesinde *L4* genine bağlı PMMoV dayanıklılığının kırılmadığı çoğu enfeksiyonların bu virüse benzer simptomolojik karakterlere sahip olan virüslere ait olduğu tespit edilmiştir. Bu veride bizleri virüslerin tanımlanmasında moleküler yöntemlerin önemini bir kez daha anlamızı sağlayan bir sonuç olarak karşımıza çıkmaktadır.

Tez kapsamında araştırılan konulardan biride PMMoV-Kum izolatının dünya izolatları içerisindeki yerinin belirlenmesi için filogenetik analizlerinin gerçekleştirilmesidir. Bunun için PMMoV-Kum izolatı için sekans hizmeti alınmış ve elde edilen izolat NCBI (Uluslararası Biyoteknoloji Merkezi) sistemine kayıt edilerek erişim numarası alınmış (**MK806437**) ve diğer araştırmacılarında kullanımına sunulmuştur. Yapılan filogenetik analizlerde PMMoV-Kum izolatının en yakın ilişkiyi 2009 yılında Sırbistan'dan elde edilen KC288153 ile oluşturmuştur. KC288153 izolatı PMMoV'in P1.2 patotipine ait olduğu rapor edilmiş bir izolat olması PMMoV-Kum izolatında bu izolata ait olabileceği düşüncesini oluşturmaktadır. Bu düşüncede aydınlatılması gereken bir diğer konunun Türkiye'de PMMoV ait hangi patotiplerin bulunduğu belirlenmesine yönelik araştırmaların yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

7. KAYNAKLAR

- Abak, K., Pitrat, M. 1981. Biberlerde Kök Boğazı Yanıklığı (*Phytophthora Capsici* Leon.) Hastalığına Dayanıklılık Üzerinde Bir Araştırma. A.Ü.Z.F. yıllığı, 29 (2-3-4), 943-947.
- Adams, M.,J., Antoniwi, J.,F., Kreuze, J. 2009. Virgaviridae: a new family of rod-shaped plant viruses. Arch Virol 154:1967–1972.
- Agrios, G., N. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Elsevier Academic Press, London.
- Alonso, E., Garcia-Luque, I., dela Cruz, A., Wicke, B., Avila-Rincon, M.,J., Serra, M.,T., Castresana, C., Diaz-Ruiz, J.,R. 1991. Nucleotide sequence of the genomic RNA of pepper mild mottle virus, a resistance-breaking tobamovirus in pepper. J Gen Virol 72:2875–2884.
- Anandakumar, P., Kamaraj, S., Jagan, S., Ramakrishnan, G., Vinodhkumar, R., Devaki, D. 2008. Capsaicin modulates pulmonary antioxidant defense system during benzo(a) pyrene-induced lung cancer in Swiss Albino mice. Phytoter Res 22:529-533.
- Anfoka,G., Abhary, M., Haj Ahmad, F., Hussein, A.,F., Rezk, A., Akad, F., Abou-Jawdah, Y., M., Lapidot, F., Vidavski, M., K., Nakhla, H., Sobh, H., Atamian, L., Cohen, I., Sobol, H., Mazyad, D., P., Maxwell and Czosnek, H. 2008. Survey Of *Tomato yellow leaf curl disease*-Associated Viruses In The Eastern Mediterranean Basin Journal of Plant Pathology, 90 (2), 311-320.
- Antignus, Y., Lachman, O., Pearlsman, M., Maslenin, L., Rosner, A. 2008. A New Pathotype of Pepper mild mottle virus (PMMoV) Overcomes the L4 Resistance Genotype of Pepper Cultivars. Plant Disease, 92(7), 1033–1037.
- Avgelis, A., D. 1986: A pepper strain of TMV who is new in Crete (Greece). Phytopathologia Mediterranea, 25: 33–38.
- Baker, C., Adkins, S.2000. Pepper, Tomatoes and Tobamoviruses. Plant Pathology Circular No. 2.
- Baker, C.,J., Orlandi, E.,W., Mock, N., M. 1993. Harpin, An Elicitor of the Hypersensitive Response in Tobacco Caused by *Erwinia amylovora*, Elicits Active Oxygen Production in Suspension Cells. Plant Physiol 102, 1341-1344.
- Banović Đeri, B., Pajić, V., Dudić, D. 2018. Revealing new information from existing genomic data for pepper mild mottle virus pathotype determination. Crop Protection, 107, 93–103.
- Berzal-Herranz, A., de la Cruz, A., Tenllado, F., Díaz-Ruiz, J., R., López, L., Sanz, A., I., Vaquero, C., Serra, M., T., and García-Luque, I. 1995. The Capsicum *L3* gene-mediated resistance against the tobamoviruses is elicited by the coat protein. Virology 209:498-505.
- Berzal-Herranz, A., de la Cruz, A., Tenllado, F., Díaz-Ruiz, J., R., López, L., Sanz, A., I., Vaquero, C., Serra, M., T., and García-Luque, I. 1995. The Capsicum *L3* gene-mediated resistance against the tobamoviruses is elicited by the coat protein. Virology 209:498-505.

- Boukema, I., W. 1980. Allelism of genes controlling resistance to TMV in *Capsicum* L. *Euphytica* 29, 433–439.
- Boukema, I., W. 1984. Resistance to TMV in *Capsicum chacoense* Hunz. is governed by an allele of the L-locus. *Capsicum Newsletter* 3:47-48.
- Boukema, I., W. 1983. Research on the location of the gene for resistance to TMV in *Capsicum chacoense* Hunz. and male sterility in progenies from the cross *C. chacoense*×*C. annuum* L. *Proceedings Vth Meeting Capsicum and Eggplant Working Group of Eucarpia*, 4-7 July, Plovdiv, Bulgaria p. 84-87.
- Briggs, F., N., Knowles, P., F. 1967 *Introduction to Plant Breeding*. Reinhold Publishing Corporation. U.S.A.
- Buzkan, N., ve Yüzer, D. 2009. Molecular detection of seed-borne viruses in Kahramanmaraş red peppers. *Alatarım*, 8(1):1-7.
- Chitra, T., R., Prakash, H., S., Albrechtsen, S., E., Shetty, H., S., and Mathur, S., B. 1999. Infection of tomato and bell pepper by ToMV and TMV at different growth stages and establishment of virus in seeds. *J. Plant Pathology*, 81, 123-126.
- Choi, G., S., Choi, S., K., Cho, I., S., Kwon, S., J. 2014. Resistance screening to pepper mild mottle virus pathotypes in paprika cultivars. *Res Plant Dis* 20: 299 –302.
- Choi, G., S., Choi, S., K., Cho, J., D., Cho, I., S. 2013. A pathotype of pepper mild mottle virus causing necrotic spot symptoms in paprika fruit. *Res Plant Dis* 19:124 –127.
- Choi, G., S., Kim, J., H., Kim, J., S., and Kim, H., R. 2004: Tobamoviruses of green peppers growing on hydroponic systems. *Res. Plant Dis.* 10, 194–197
- Choi, S., K., Choi, G., S., Kwon, S., J., Yoon, J., Y. 2016. Complete Nucleotide Sequences and Genome Organization of Two Pepper Mild Mottle Virus Isolates from *Capsicum annuum* in South Korea . *Genome Announcements*, 4(3).
- Csillery, G., Tobias, I., Rusko, J. 1983. A new pepper strain of tomato mosaic virus. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* 18, 195-200.
- Çağlar, B., K., Fidan, H., and Elbeaino, T. 2012. Detection and Molecular Characterization of Pepper Mild Mottle Virus from Turkey. *Journal of Phytopathology*, 161(6), 434–438.
- Dardick, C., D., Taraporewala, Z., Lu, B., and Culver, J., N. 1999. Comparison of tobamovirus coat protein structural features that affect elicitor activity in pepper, eggplant, and tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12:247-251.
- Deom, C.M., Oliver, M.J., Beachy, R., N. 1987. The 30-kilodalton gene product of tobacco mosaic virus potentiates virus movement. *Science* 237, 389-394
- Deri, B., Pajic, V., Dudic, D. 2018. Revealing new information from existing genomic data for pepper mild mottle virus pathotype determination. *Crop Protection*, 107, 93–103.
- Eman, A., H. 2006. Biological, Serological and Molecular Detection of Pepper Mottle Virus Infecting Pepper Plants in Egypt Egypt. *J. Phytopathol.*;34:121-138.

- Fari, M., Csillery, G., 1983. In vitro shoot tip culture of some Capsicum spp. Capsicum Newslett. 2, 70–73.
- Fauquet, C., M., Mayo, M., A., Maniloff, J., Desselberger, U., and Ball, L., A. 2005. Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, London
- Fidan, H., Adak, N., A., Konuksal, A., Akerzurumlu, E., Yilmaz, M., A. 2011. Occurrence of *Alfalfa Mosaic Virus* (AMV) Diseases on Potato Crops in Northern Cyprus, 5th Balkan Symposium on Vegetables and Potatoes, Tirana, Arnavutluk, 960: 341-346.
- Fidan, H., Sari, N. 2019: Molecular characterization of resistance-breaking tomato spotted wilt virus (TSWV) isolate medium segment in tomato. Applied Ecology and Environmental Research 17(2):5321-5339.
- Flor, H., H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. Annu Rev Phytopathol 9, 275–296.
- Genda, Y., Kanda, A., Hamada, H., Sato, K., Ohnishi, J., and Tsuda, S. 2007. Two amino acid substitutions in the coat protein of Pepper mild mottle virus are responsible for overcoming the *L4* gene-mediated resistance in Capsicum spp. Phytopathology 97:787-793.
- Genda, Y., Kanda, A., Hamada, H., Sato, K., Ohnishi, J., Tsuda, S. 2007. Two Amino Acid Substitutions in the Coat Protein of Pepper mild mottle virus Are Responsible for Overcoming the *L4* Gene-Mediated Resistance in Capsicum spp. Phytopathology, 97(7), 787–793.
- Genda, Y., Sato, K., Nunomura, O., Hirabayashi, T. and Tsuda, S. 2011. Immunolocalization of Pepper mild mottle virus in developing seeds and seedlings of Capsicum annuum. Journal of General Plant Pathology, 77, 201-208.
- Gilardi, P., Wicke, B., Castillo, S., de la Cruz, A., Serra, M. T. & Garcí'a-Luque, I. 1999. Resistance in Capsicum spp. against the tobamoviruses. In Recent Research Developments in Virology, vol. 1, pp 547–558. Edited by S. G. Pandalai. India: Transworld Research Network.
- Güldür, M., E., Çağlar, B., K. 2006. Outbreaks of pepper mild mottled virus in greenhouses in Sanliurfa, Turkey. J Plant Pathol 88:339-342
- Hall, T., A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Oxford University Press, Nucleic Acids Symposium Series No.41: 95-98
- Hamada, H., Tomita, R., Iwade, Y., Kobayashi, K., Munemura, I., Takeuchi, S., Suzuki, K. 2006. Cooperative effect of two amino acid mutations in the coat protein of Pepper mild mottle virus overcomes *L3* -mediated resistance in Capsicum plants. Virus Genes, 34(2), 205–214.
- Han, S., H., Park, J., S., Han, J., Y., Gong, J., S., Park, C., H., Kim, J., K., Lim, H., S., 2017. New Korean isolates of Pepper mild mottle virus (PMMoV) differ in symptom severity and subcellular localization of the 126kDa protein. *Virus Genes*, 53(3), 434-445.

- Holt, C., A., Beachy, R., N. 1991. In vivo complementation of infectious transcripts from mutant tobacco mosaic virus cDNAs in transgenic plants. *Virology* 181, 109-117.
- Ikegashira, Y., Ohki, T., Ichiki, U., Higashi, T., Hagiwara, K., Omura, T., Honda, Y., Tsuda, S. 2004. An immunological system for the detection of Pepper mild mottlevirus in soil from green pepper fields. *Plant Dis* 88, 650-656
- Janzac, B., Fabre, M., F., Palloix, A., and Moury, B. 2009: Phenotype and spectrum of action of the Pvr4 resistance in pepper against potyviruses, and selection of virulent variants. *Plant Pathol.* 58, 443–449.
- Jarret, R., L., Gillaspie, A., G., Barkley, N., A., Pinnow, D., L. 2008. The Occurrence and Control of Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV) in the USDA/ARS Capsicum Germplasm Collection. *Seed technology.* v.30 no.1 pp. 26
- Kenyon, L., Kumar, S., Tsai, W., S., Hughes, J., A. 2014. Virus Diseases of Peppers (*Capsicum* spp.) and Their Control. *Advances in Virus Research*, 297–354.
- Kim J, Lee S, Choi H, Kim M, Kwak H, Nam M, Kim J, Choi G, Cho J, Cho I, Chung B. Occurrence of Virus Diseases on Major Crops in 2010. *Res Plant Dis.* 2011;17:334–341.
- Kim, H., J., Han, J., H., Yoo, J., H., Cho, H., J. and Kim, B., D. 2008: Development of a sequence characteristic amplified region marker linked to the L4 locus conferring broad spectrum resistance to tobamoviruses in pepper plants. *Mol. Cells.* 25, 205–210.
- King, A., M., Q., Adams, M., J., Carstens., E., B., Lefkowitz., E., J. 2012. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier Academic Press, San Diego
- Klement, Z. 1982. Hypersensitivity. In *Phytopathogenic Prokaryotes*, pp. 149–177.
- Kumar, S., Udaya, A., C., Nayaka, S., C., Lund, O., S., Prakas, H., S. 2011. Detection of *Tobacco mosaic virus* and *Tomato mosaic virus* in pepper and tomato by multiplex RT-PCR. *Letter in applied Microbiology*, 359-363.
- Kwon, S., J., Yoon, J., Y., Cho, I., S., Choi, G., S. 2015. First report and complete genome sequence of pepper mild mottle virus in *Rorippa palustris* growing near pepper fields in Korea. *The Korean Society of Plant Pathology : K ; Virology and Virus Diseases : K-32*
- Lamb, E., M., Atkins, S., Schuler, K., D., Roberts, P., D. 2001. Pepper mild mottle virus. *University of Florida, IFAS Extension Bulletin*, p808
- Lee, J. 2019. Development and Evolution of Molecular Markers and Genetic Maps in *Capsicum* Species. *Biochemistry and Cell Biology of Ageing: Part I Biomedical Science*, 85–103.
- Lee, J., Han, J., H., Yoon, J., B. 2012. A set of Allel-specific Marker Linked to L Locus Rasistant to Tobamovirus in *Capsicum* spp. *Hort. Sci Technol.* 30(3):286-293.
- Lee, S., H., Lee, J., B., Kim, S., M., Choi, H., S., Park, J., W., Lee, J., S., Lee, K., W., Moon, J., S. 2004. The Incidence and Distribution of Viral Diseases in Pepper by Cultivation Types. *Res. Plant Dis.* 10(4):231-240

- Lee, S.,H., Lee, J., B., Kim, S.,M.,Choi, H., S., Park, J., W.,Lee, J., S., Lee, K., W., Moon, J.,S. 2004. The Incidence and Distribution of Viral Diseases in Pepper by Cultivation Types.Research in Plant Disease.Volume 10 Issue 4,Pages.231-240
- Lefebvre, V., Pflieger, S., Thabuis, A., Caranta, C., Blattes, A., Chauvet, J., C., Daubeze, A., M., Palloix, A.2002 Towards the saturation of the pepper linkage map by alignment of three intraspecific maps including known-function genes.Genome 45(5):839-854.
- Liu, H., W., Luo, L., X., Li, J., Q., Liu, P., F., Chen, X., Y.,. and Hao, J., J. 2014. Pollen and seed transmission of Cucumber green mottle mosaic virus in cucumber. Plant Pathology, 63, 72-77.
- Matsunaga, H., T., Saito, M., Hirai, T., Yoshida, T. 2003: DNA markers linked to pepper mild mottle virus (PMMoV) resistant locus (*L4*) in Capsicum. J. Japan Soc. Hort. Sci. 72, 218–220.
- Mavric, I., Tusek, M., Virscek, M., Dolnicar, P., Mehle, N., Lesemann, D., E., Ravnikar, M. 2006.First report of Eggplant mottled dwarf virus in potato and tomato in Slovenia. Plant Pathology, 55(4), 566–566.
- Mckinney, H., H. 1952. Two strains of Tobacco mosaic virus, one of which is seed-borne in an etch-immune pungent pepper. Plant Disease Report, 36, 184–187.
- Meshi, T., Watanabe, Y., Saito, T., Sugimoto, A., Maeda, T., y Okada, Y. 1987. Function of the 30 kd protein of tobacco mosaic virus: involvement in cell-to-cell movement and dispensability for replication. EMBO J 6 , 2557-2563
- Milosevic,D., Stankovic,I., Bulajic,A., Nikolic,Z., Ignjatov,M. and Krstic,B.2012. Molecular characterization of Pepper mild mottle virus in Serbia.Genetika, Vol. 47, No.2, 651-663, 2015
- Moury, B., and Verdin, E. 2012. Viruses of Pepper Crops in the Mediterranean Basin. Viruses and Virus Diseases of Vegetables in the Mediterranean Basin, 127–162.
- Moury, B., Palloix, A., Caranta, C., Gognalons, P., Souche, S., Selassie, K. G., Marchoux, G. 2005. Serological, Molecular, and Pathotype Diversity of Pepper veinal mottle virus and Chili veinal mottle virus. Phytopathology, 95(3), 227–232.
- Nelson, R., S., and Van Bel, A., J., E. 1998. The mystery of virus trafficking into, through and out of vascular tissue. Progr Bot 59, 476-533
- Oparka, K., J., Prior, D., A., Santa Cruz, S., Padgett, H., S., Beachy, R., N. 1997. Gating of epidermal plasmodesmata is restricted to the leading edge of expanding infection sites of tobacco mosaic virus (TMV). Plant J 12, 781-789
- Ozaslan,M., Bas, B., Aytekin, T., Sigirci, Z. 2006. Identification of Pepper Viruses by Das-elisa Assays in Gaziantep-Turkey. Plant Pathology Journal, 5: 11-14.
- Paran, I., Van Der, J., R., Lefebvre, V., Jahn, M., Landry, L., Van Schriek, M., Tanyolac, B., Caranta, C., Chaim, A., B., Livingstone, K., Palloix, A., Peleman, J. 2004 An integrated genetic linkage map of pepper (*Capsicum* spp.). Mol Breed 13:251–261.

- Pares, R., D., Gunn, L., V. 1989. The role of non-vectored soil transmission as a primary source of infection by pepper mild mottle and cucumber mosaic viruses in glasshouse grown capsicum in Australia. *Journal of Phytopathology* 126: 353–360.
- Pehlivan, D. 2013. Adana ve Mersin illerinde domates kloroz virüsü (Tomato chlorosis virus, ToCV)’ nün saptanması ve moleküler karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 52 pp
- Peng, J., Shi, B., Zheng, H., Lu, Y., Lin, L., Jiang, T., Chen, J., Yan, F. 2015. Detection of pepper mild mottle virus in pepper sauce in China. *Arch Virol* 160: 2079 – 2082.
- Pernezny, K.; Roberts, P., D.; Murphy, J., F.; Goldberg, N., P. 2003. Compendium of Pepper Diseases. St. Paul, Minnedota: The American Phytopathological Society. p. 73
- Petrov, N. 2014. Effect Of Pepper Mild Mottle Virus Infection On Pepper And Tomato Plants. *Science & Technologies*. Volume IV, Number 6, 2014
- Rast, A., T., B. 1988. Pepper tobamoviruses and pathotypes used in resistance breeding. *Capsicum Newsl.* 7:20-23.
- Ruiz, J., Garcia, C., Siman, A., Janssen, D. 2016. First report of a new pepper mild mottle virus pathotype 1,2 on pepper in Spain. *Journal of Plant Pathology*. 98(3), 677-697.
- Sawada, H., Takeuchi, S., Matsumoto, K., Hamada, H., Kiba, A., Matsumoto, M., Watanabe, Y., Suzuki, K., and Hikichi, Y. 2005. A new Tobamovirus-resistance gene, Hk, in *Capsicum annum*. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 74:289–294
- Scholthof, K., B., G., S., Adkins, H., Czosnek, P., Palukaitis, E., Jacquot, T., Hohn, B., Hoh, K., Saunders, T., Candresse, P., Ahlquist, C., And Foster, G., D. 2011: Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 12, 938–954.
- Sevik, M. A.; Kose-Tohumcu, E. 2011 The ELISA analysis results in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed health testing for Tobacco mosaic virus. *Vol.98 No.3 pp.301-306 ref.24*
- Simon-Buela, L., and García-Arenal, F. 1999. Virus particles of cucumber green mottle mosaic tobamovirus move systemically in the phloem of infected cucumber plants. *Mol Plant Microbe Interact* 12, 112-118.
- Sugita, T., Yamaguchi, K., Sugimura, Y., Nagata, R., Yuji, K., Kinoshita, T., and Todoroki, A. 2004. Development of SCAR Markers Linked to L3 gene in *Capsicum*. *Breeding Science*, 54(2), 111–115.
- Svoboda, J., Cervena, G., Rodoca, J., Jokes, M. 2002. First report of pepper mild mottle virus in pepper seeds produced in the Czech Republic. *Plant Protect.Sci.* Vol 42, No.1:34-37
- Tena, F., Molina-Galdeano, M., Serra, M. T., & García-Luque, I. 2012. A single amino acid in the helicase domain of PMMoV-S is responsible for its enhanced accumulation in *C. chinense* (L3L3) plants at 32°C. *Virology*, 427(1), 34–43.

- Tena, F., Molina-Galdeano, M., Serra, M.T., García-Luque, I. 2012. A single amino acid in the helicase domain of PMMoV-S is responsible for its enhanced accumulation in *C. chinense* (L(3)L(3)) plants at 32 degrees C. *Virology* 427, 34-43.
- Tobias, I., Almasi, A., Csillery, G., Nemes, K., Salanki, K. 2017. Virus diseases of pepper (*Capsicum annum*) in Hungary. *Journal of International Scientific Publications*
- Tomita, R., Ken-Taro, S., Hiroyuki, M., Sakamoto, M., Murai, J., Kiba, A., Hikichi, Y., Suzuki, K., and Kobayashi, K. 2011. Genetic basis for the hierarchical interaction between Tobamovirus spp. and L resistance gene alleles from different pepper species. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24:108–117
- Tomita, R., Murai, J., Miura, Y., Ishihara, H., Liu, S., Kubotera, Y., Kobayashi, K. 2008. Fine mapping and DNA fiber FISH analysis locates the tobamovirus resistance gene L 3 of *Capsicum chinense* in a 400-kb region of R-like genes cluster embedded in highly repetitive sequences. *Theoretical and Applied Genetics*, 117(7), 1107–1118.
- Tsuda, S., Kirita, M., Watanabe, Y. 1998. Characterization of a pepper mild mottle tobamovirus strain capable of overcoming the *L3* gene-mediated resistance, distinct from the resistance-breaking Italian isolate. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11(4):327-331.
- Tsuda, S., Kirita, M., Watanabe, Y. 1998. Characterization of a pepper mild mottle tobamovirus strain capable of overcoming the *L3* genemediated resistance, distinct from the resistance-breaking Italian isolate. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:327-331.
- TÜİK, 2016. Veritabanları Bitkisel Üretim İstatistikleri <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>
- Van Duin, P., J., W. 1998. Xth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of *Capsicum* & Eggplant, Avignon, France.
- Velasco, L., Janssen, D., Ruiz-Garcia, L., Segundo, E., Cuadrado, I., M. 2002 The complete nucleotide sequence and development of a differential detection assay for a pepper mild mottle virus (PMMoV) isolate that overcomes *L3* resistance in pepper. *J. Virol. Methods.* 106(1):135-140.
- Velasco, L., Janssen, D., Ruíz-García, L., Segundo, E., Cuadrado, I., M. 2002. The complete nucleotide sequence and development of a differential detection assay for a pepper mild mottle virus (PMMoV) isolate that overcomes *L3* resistance in pepper. *J Virol Methods* 106, 135-140.
- Wetter, C. 1984. Serological identification of four tobamoviruses infecting pepper. *Plant Disease*, 68(7):597-599
- Wetter, C., Conti, M., Altschuh, D., Tabillion, R., Van Regenmortel, M., H., V. 1984 Pepper Mild Mottle Virus, a Tobamovirus infecting pepper cultivars in Sicily. *Phytopathology* 74(4): 405–10.

- Wolf, S., Deom, C., M., Beachy, R., N., Lucas, W., J. 1989. Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science* 246, 377-379.
- Yamaguchi, T., Sugimura, K., Nagata, Y., Yuji, R., Kinoshita, K., T., Todoroki, A. 2004. Development of SCAR Markers Linked to L3 gene in Capsicum. *Breeding Science*, 54(2), 111–115.
- Yang, H., B., Liu, W., Y., Kang, W., H., Jahn, M., Kang, B., C. 2009. Development of SNP markers linked to the L locus in Capsicum spp. by a comparative genetic analysis. In *Molecular Breeding*, vol. 24, no. 4, pp. 433–446.
- Yang, H., B., Liu, W., Y., Kang, W., H., Kim, J., H., Cho, H., J., Yoo, J., H., Kang, B., C. 2012. Development and validation of L allele-specific markers in Capsicum. in *Molecular Breeding*, vol. 30, no. 2, pp. 819–829.



8. EKLER

EK.1 – Total Nükleik Asit Protokolü

1- 100-400 mg örnek, 1.2 ml ekstraksiyon buffer (100 mM Tris, pH 8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol)'da ezilmiştir.

2- Ezilmiş örnekten 600 µl alınıp 1.5 ml'lik tüplere konulmuştur. Üzerine %10'luk SDS'den 70 µl eklenip 65 °C'de 10 dk bekletilmiştir. Bekleme esnasında tüpler bir veya iki kez karıştırılmıştır.

3-200 µl 5 M potasyum asetat, tüplere eklendikten sonra buzda 10 ila 30 dakika arasında bekletilmiştir.

4- Buzdan alınan örnekler 10 dk 10.000 rpm'de santrifüj edilmiş, sıvı kısımdan 600 ml alınarak yeni 1.5 ml'lik tüplere konulmuştur.

5- 300 µl soğuk izopropanol eklenerek 25-30 dk buz içinde bekletilmiştir.

6- 10 dk 10.000 rpm'de santrifüj edilmiş, süpernatant (sıvı) dikkatlice ortamdan uzaklaştırılmıştır.

7- -20 °C de saklanan soğuk %70'lik etanol den 750 µl pellete eklenip kibarca karıştırılmıştır.10 dk 10.000 rpm'de santrifüj yapılmıştır.

8- Çökelti üzerinde kalan sıvı, tüplerden dikkatlice uzaklaştırılmış, 15 sn'lik kısa bir santrifüj daha yapıldıktan sonra alkol, pipetle çekilmiştir.

9- Pellet 10 dk kurutulmuş, üzerine 400 µl steril distile su eklenerek karıştırılmıştır.

10- 37 °C'de 15 dk. inkübe edilmiş ve inkübasyon sırasında bir iki kez hafifçe karıştırılmıştır.

11- Elde edilen total nükleik asitten 5-10 µl alınıp elektroforez sonuç kontrolünden sonra -20 °C ya da -80 °C'de saklanmıştır.

Not: Ekstraksiyon çözeltisi kullanmadan kısa bir süre önce ve steril ortamda hazırlanmıştır (Tris, NaCl ve EDTA.)

EK 2 FOSFAT TAMPON ÇÖZELTİSİ;

Değişik PH değerlerinde Kimyasalların aldığı PH Faktörleri

PH değeri	KH_2PO_4	Na_2HPO_4
6.2	0.800	0.200
6.4	0.715	0.285
6.6	0.614	0.386
6.8	0.500	0.500
7.0	0.386	0.614
7.2	0.285	0.715
7.4	0.200	0.800
7.6	0.137	0.863
7.8	0.090	0.910
8.0	0.059	0.941
8.2	0.038	0.962

Moleküler ağırlık (MA) $\times$ Hacim (lt) $\times$ Molarite $\times$ PH Faktörü

Örnek 0,02 M PH 7.0 1 litre Fosfat Tampon Çözelti Hazırlama

$\text{KH}_2\text{PO}_4 = 136.08 \times 1\text{lt} \times 0,02 \times 0,386 = 1,1 \text{ gr}$

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 141.96 \times 1\text{lt} \times 0,02 \times 0,614 = 1,7 \text{ gr}$ alınıp

950 mlt saf suda çözünür pH kontrol edilir% 0.1 Mercaptoethanol ilave edilir. 1 lt ye tamamlanır

EK 3 Total Nükleik Analizlerinde Kullanılan Çözelti ve Solusyonlar

1. Ekstraksiyon tamponu

Aşağıda belirtilen miktardaki kimyasallar 150 ml steril saf su içerisinde manyetik karıştırıcıda çözünmüş ve pH'sı ayarlanarak 200 ml tamamlanmıştır. Daha sonra 1/1000 v/v oranında 2.B.Mercaptoethanol ilave edilmiştir.

(100 mM Tris-HCl (pH: 8.0), 50 mM EDTA (pH:7,0), 500 mM NaCl, 10 mM 2.B.Mercaptoethanol).

Tris- HCl	2.422gr
EDTA	3,722 gr
NaCl	5,844 gr

2. %20 SDS (Sodium Dodecyl Sulphate)

20 gr SDS tartılmış ve 80 ml steril saf su içerisinde ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda çözdürülmüştür. Daha sonra saf su ilave edilerek 100 ml tamamlanmış ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3. 5 M Potasyum Asetat (CH₃COOK)

60 ml steril saf su içerisinde 49,07 gr potasyum asetat çözdürülmüş ve daha sonra 100 ml'ye tamamlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

4. 3M Sodyum Asetat (CH₃COONa)

60 ml steril saf su içerisinde 40,82 gr sodyum asetat çözdürülmüş ve daha sonra 100 ml'ye tamamlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

5. %70 lik ETOH

% 99 Ethanol'den 707 ml alınarak 293 ml saf su ilave edilmiş ve hazırlanan bu %70 ETOH

+4°C'de kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir

ÖZGEÇMİŞ

MURAT BARUT

murat_barut07@hotmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2015-2019	Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Bölümü, Antalya
Lisans	Selçuk Üniversitesi
2004-2008	Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Konya

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Satış Temsilcisi	Rijk Zwaan Tarım Tic. Ltd. Şti
2018-Devam Ediyor	
Ticari Satış Temsilcisi	Bayer Türk Kimya San. Ltd. Şti.
2012-2018	