



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***pvr* LOKUSU İÇEREN BİBERLERDE PATATES Y
VİRÜS (*Potato virus Y*, PVY) REAKSİYONLARININ
ARAŞTIRILMASI**

KERİM KARATAŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

KAHRAMANMARAŞ 2014

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

pvr LOKUSU İÇEREN BİBERLERDE PATATES Y
VİRÜS (*Potato virus Y*, PVY) REAKSİYONLARININ
ARAŞTIRILMASI

KERİM KARATAŞ

Bu tez,
Bitki Koruma Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS
derecesi için hazırlanmıştır.

KAHRAMANMARAŞ 2014

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Kerim KARATAŞ tarafından hazırlanan “*pvr* LOKUSU İÇEREN BİBERLERDE PATATES Y VİRÜS (*Potato Virus Y*, PVY)’ REAKSİYONLARININ ARAŞTIRILMASI” adlı bu tez, jürimiz tarafından 20 /10 /2014 tarihinde oy birliği ile Bitki Koruma Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nihal BUZKAN
Bitki Koruma Ana Bilim Dalı,
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Prof. Dr. İrfan Ersin AKINCI
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı,
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Mustafa KÜSEK
Bitki Koruma Ana Bilim Dalı,
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. M. Hakkı ALMA

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Kerim KARATAŞ

Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2013/7-5YLS

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

***pvr* LOKUSU İÇEREN BİBERLERDE PATATES Y VİRÜS (*Potato virus Y*, PVY)
REAKSİYONLARININ ARAŞTIRILMASI
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

Kerim KARATAŞ

ÖZET

Bu çalışmada, baharat yapımına uygun aday 43 kırmızı biber hattının Patates Y virüsü (PVY)'ün (0), (0,1), ve (0,1,2) patotiplerine reaksiyonları araştırılmıştır.

PVY'nün, LYE84 (0), CAA16 (0,1) ve SON41P (0,1,2) izolatları *Nicotiana tabacum* L. " Samsun " tütün çeşidi üzerinde çoğaltılmış ve virüsün varlığı PVY poliklonal antiserum kullanılarak DAS-ELISA testi ile doğrulanmıştır. Daha sonra patotiplerin *pvr* lokusuyla ilişkileri Yolo Wonder, Yolo Y, Florida VR2 ve W4 biber genotiplerinde biyolojik ve serolojik olarak kontrol edilmiştir. Denemeye alınan kırmızıbiber hatlarına, PVY patotipleri mekanik olarak inokule edilmiştir. Biber hatlarında PVY patotiplerinin çoğalması ve yayılması, pozitif kontrollerde ilk belirtileri takiben DAS-ELISA testiyle üç hafta süreyle izlenmiştir.

PVY (0) patotipi, bitki yapraklarında mozaik, PVY (0,1) patotipi, yaprak yüzeyinde deformasyon, yapraklarda içe kıvrılma, bitki gövdesinde şekil bozukluğu ve meyvede şeritler halinde renk açılması belirtileri oluşturmuştur. PVY (0,1,2) patotipi, yaprak damarı çevresinde nekrozlar oluşturmuş ve yapraklar dökülmüştür. Üç kırmızıbiber hattında PVY patotiplerinden kaynaklı belirtiler meydana gelmemiştir. Serolojik testlerden alınan sonuçlara göre, bu üç hattın, PVY'nün üç patotipine dayanıklı aday hatlar olduğunu söylemek mümkün olmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Capsicum annuum*, PVY, patotip, ELISA, *Potyvirus*

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalı, Ekim /2014

Danışman: Prof. Dr. Nihal BUZKAN

Sayfa sayısı: 33

**INVESTIGATION FOR REACTIONS OF PEPPERS with *pvr* LOCI TO *Potato virus Y* (PVY)
(M.Sc. THESIS)**

Kerim KARATAŞ

ABSTRACT

Reactions of 43 red pepper lines to PVY pathotypes, (0), (0,1), (0,1,2) were investigated in this study.

PVY isolates LYE84, CAA16 and SON41P which are actually PVY pathotypes (0), (0,1) and (0,1,2) subsequently were multiplied in *Nicotiana tabacum* L. "Samsun" and the virus presence was confirmed ELISA tests. The relationship between pathotypes and *pvr* loci was biologically and serologically checked onto Yolo Wonder, Yolo Y, Florida VR2 and W4 pepper genotypes. PVY pathotypes were mechanically inoculated into red pepper lines. The virus multiplication and spread regarding three pathotypes were tested by DAS-ELISA for three weeks after first symptom appearance in positive controls.

PVY (0) caused leaf mosaic while PVY (0,1) induced deformation on leaf surface, downward leaf rolling, stem deformation and elongated color deformation on fruits. PVY (0,1,2) caused necrosis along the veins and defoliation afterwards. Three lines did not have any symptoms due to virus infection. They were accepted as resistant candidates to three of PVY pathotypes according to serological tests.

Key Words: *Capsicum annuum*, PVY, pathotype, ELISA, *Potyvirus*

University of Kahramanmaraş Sütçü İmam
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Protection, October / 2014

Supervisor: Prof. Dr. Nihal BUZKAN

Page Number: 33

TEŞEKKÜR

Araştırma konusunu veren ve Yüksek Lisans programı süresince yardımlarını benden esirgemeyen, çalışmalarım esnasında her türlü desteğini aldığım, her türlü özveriyi gösteren değerli hocam Prof Dr. Nihal BUZKAN' a teőekkürlerimi sunarım. Sera ve laboratuvar çalışmalarında, yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. B. Bülent ARPACI'ya teőekkürlerimi sunarım. Bitkilerin yetiştirilmesinde ve ELISA testi çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Yüksek Lisans öğrencileri; Ayşe Gül TEKİK ve Nagehan Zerrin ÖZKARCI'ya teşekkür ederim. Yüksek Lisans tez jürisinde yer olan hocalarıma tezimin biçimlenmesinde ve değerlendirilmesinde verdikleri olumlu katkılardan dolayı teşekkür ederim. Bana her türlü yardım ve desteği esirgemeyen sevgili aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET.....	I
SUMMARY.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
2.1. Dünya'daki Çalışmalar.....	4
2.2. Türkiye'deki Çalışmalar.....	7
3. MATERYAL VE METOT.....	10
3.1. Materyal.....	10
3.2. Metot.....	10
3.2.1. Fidelerin yetiştirilmesi.....	10
3.2.2. Biyolojik indeksleme.....	11
3.2.3. Mekanik inokulasyon.....	11
3.2.4. DAS-ELISA testi.....	12
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	13
4.1. Simptomatolojik Gözlemler.....	13
4.1.1. PVY patotiplerinin tütün bitkisinde oluşturduğu belirtiler.....	13
4.1.2. PVY patotiplerinin biber genotiplerinde oluşturduğu belirtiler.....	13
4.1.3. PVY patotiplerinin biber hatlarında oluşturduğu belirtiler.....	16
4.2. Serolojik Testler.....	21
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	25
KAYNAKLAR.....	27
EKLER.....	30
ÖZGEÇMİŞ.....	33

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMV	: <i>Alfalfa mosaic virus</i>
CMV	: <i>Cucumber mosaic virus</i>
D	: Dayanıklı
DAS-ELISA	: Double antibody sandwich- <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FAO	: Organization for Food and Agriculture
H	: Hassas
kb	: Kilobaz
µl	: Mikrolitre
nm	: Nanometre
O.D.	: Optical density (optik yoğunluk)
PepMoV	: <i>Pepper mottle virus</i>
PMMoV	: <i>Pepper mild mottle virus</i>
PLRV	: <i>Potato leafroll virus</i>
PVA	: <i>Potato virusA</i>
PVBV	: <i>Pepper vein banding virus</i>
PVM	: <i>Potato virus M</i>
PVX	: <i>Potato virusX</i>
PVY	: <i>Potato virus Y</i>
PepYMV	: <i>Pepper yellow mosaic virus</i>
TEV	: <i>Tobacco etch virus</i>
TMV	: <i>Tobacco mosaic virus</i>
ToMV	: <i>Tomato mosaic virus</i>
TSWV	: <i>Tomato spotted wilt virus</i>
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
VPg	: Viral protein geni

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.1. Mekanik inokulasyon yapılmış biber fidesi.....	11
Şekil.4.1. PVY patotiplerinin tütün bitkisinde oluşturduğu simptomlara:Yapraklarda mozaik b: Yapraklarda şekil bozukluğu:c:Yapraklarda mozaik ve sarı lekeler d: Yapraklarda sararma.....	13
Şekil 4.2. PVY izolatlarının Yolo Wonder genotipinde oluşturduğu simptomlar; a) PVY (0); mozaik, kloroz, b) PVY (0,1); mozaik, şekil bozukluğu ve renk açılması, c) PVY (0,1,2); mozaik, şekil bozukluğu ve nekroz.....	14
Şekil 4.3. PVY izolatlarının Yolo Y genotipinde, oluşturduğu simptomlar. a)PVY (0); simptom yok, b) PVY (0,1); mozaik, şekil bozukluğu, c) PVY(0,1,2); nekroz.....	15
Şekil 4.4. PVY (0,1,2) izolatının Florida VR2 genotipinde yapraklarda meydana getirdiği şekil bozukluğu, damar bantlaşması ve kloroz simptomları.....	15
Şekil 4.5. Biber hatlarında, PVY(0,1) ve PVY(0,1,2) patotiplerinin, mekanik inokulasyondan bir ve iki hafta sonra oluşan simptomlar a: Yaprak yüzeyinde deformasyon (1 hafta sonra) b: Yaprak yüzeyinde deformasyon ve yaprağın içe kıvrılması (iki hafta sonra) kabarcık...	16
Şekil 4.6. PVY (0) patotipinin biber hatlarında oluşturduğu simptomlar a:Mozaik, b: Damar nekrozu.....	19
Şekil 4.7. PVY (0,1,2) patotipinin biber hatlarında oluşturduğu simptomlar a: Yaprak yüzey deformasyonu ve şekil bozukluğu b: Yapraklarda nekroz.....	19
Şekil 4.8. PVY (0,1) patotipinin biber hatlarında oluşturduğu simptomlar; a: Yaprak yüzey deformasyonu, içe kıvrılma ve renk açılması b: Yaprak şekil bozukluğu c: Gövde şekil bozukluğu ve yapraklarda sararma d: Meyvelerde boyuna renk açılması.....	20

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 3.1. Biber genotiplerinin PVY patotiplerine reaksiyonları ve bulundukları <i>pvr</i> lokusları.....	10
Çizelge 4.1. PVY izolatlarının, patotip ayırım setinde bulunan referans biber bitkilerinde oluşturduğu belirtiler.....	14
Çizelge 4.2. PVY patotiplerinin, Yolo Wonder, Yolo Y, Florida VR2 ve W4 genotiplerine inokulasyonu sonrası ELISA testi O.D. (405 nm) değeri.....	16
Çizelge 4.3. PVY patotiplerinin, kırmızıbiber hatlarında mekanik inokulasyon sonrası oluşturduğu belirtiler.....	17
Çizelge 4.4. PVY patotipleriyle inokule edilmiş biber hatlarından 3.,4., ve 7. haftalarda ELISA testinde alınan O.D.(405 nm) değeri.....	22
Çizelge 4.5. Seçilen biber hatlarında 3., 6.,ve 7. haftalarda PVY patotipleri için yapılan ELISA testinden alınan O.D. (405 nm) değeri.....	24

1. GİRİŞ

Solanaceae familyasına dahil olan *Capsicum* cinsi içerisinde bilinen yaklaşık 30 türden *Capsicum annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* L., *C. frutescens* L., ve *C. pubescens* L. türleri kültüre alınmıştır (Pickersgill, 1997).

Gıda işleme sanayinde ticari olarak kullanılan birçok biber ürünü, *C. annuum* L. türünün meyvelerinden elde edilir. Birçok biber çeşidi, taze veya pişirilmiş olarak tüketilebilen, sos, turşu, salça, kurutulmuş baharat yapımında ve oleoresin imalatında hammadde olarak kullanılabilen meyveleri için yetiştirilir. Parçalanarak pul haline getirilen ya da öğütülerek toz şekline getirilmiş hali baharat olarak kullanım şeklidir.

Dünyada en çok biber üretimi yapan ülke 16.000.000 ton ile Çin'dir. Meksika 2.379.736 ton ile ikinci sırayı alırken, Türkiye ise 2.072.132 ton ile üçüncü sıradadır. Kurutulmuş kırmızıbiber üretiminde ise 1.299.940 ton ile Hindistan ilk sırada yer almaktadır (FAO, 2012). Türkiye, 198.636 ton baharatlık biber üretimine sahiptir (TÜİK, 2013).

Biberin, dünyada ve ülkemizde yetiştiriciliğini sınırlayan önemli sorun, biber hastalıklarıdır. Bu hastalıkların en tehlikelisi olarak kabul edilen, biber kök boğazı yanıklığı (*Phytophthora capsici* Leon) (Yoon ve ark., 1988) ve viral etmenlerdir.

Kahramanmaraş ve çevre illerde, baharatlık kırmızıbiber üretimi yoğun olarak yapılmaktadır ve yöre için büyük bir geçim kaynağıdır. Bu yörede, baharatlık kırmızıbiberin tarla yetiştiriciliği şeklinde yıllardır yapılması; fungal, bakteriyel ve viral etmenlerin varlığını artırmıştır. Bunlar içerisinde biberlerde enfeksiyon oluşturan virüsler verim ve kaliteyi düşürmek suretiyle, ekonomik kayıplara neden olmaları bakımından ayrı bir öneme sahiptir. Virüs enfeksiyonları yıldan yıla ve mevsimden mevsime değişmektedir.

Dayanıklılık konukçu, patojen, çevre üçgeninde oluşmakta ve bunlardan etkilenmektedir. Poligenik dayanıklılıklarda bu üç faktör birbirini daha fazla etkilemektedir. Dayanıklılık çalışmalarında, ilk dönemlerde yalnızca bitki yönü ele alınırken, daha sonra bitki patolojisindeki gelişmelerle dayanıklılıkta patojen genomunun da etkili olduğu üzerinde durulmuştur. Bunun sonucunda, “geniçin-gen” ya da “gene karşı gen” teorisi ortaya atılmıştır (Flor, 1971). Bu teori, patojende bulunan avirulens gen ya da gen ürününü, konukçudaki dayanıklılıktan sorumlu olan gen ya da gen ürününü uyarılması olarak açıklanabilir. Çiftlerden birinin eksikliğinde hastalık ortaya çıkmaktadır. Biberde verim ve kalite kaybına sebep olan 43 adet virüsten en önemlileri Hıyar mozaik virüsü

(CMV), Patates Y virüsü (PVY), Biber çizgili damar virüsü (PVBV), Tütün mozaik virüsü (TMV) dür (Palloix ve ark., 1994a).

Akdeniz kıyısı boyunca, biberlerde ekonomik zarar yapan virüsler ise; Tütün mozaik virüsü (TMV), Hıyar mozaik virüsü (CMV), Tütün yanıklık virüsü (TEV) (Yılmaz ve Davis, 1985).Kahramanmaraş ili Merkez, Türkoğlu ve Pazarcık ilçelerinde biberlerde enfeksiyon oluşturan virüsler; Yonca mozaik virüsü (AMV), Patates X virüsü (PVX), Biber hafif benek virüsü PMMoV)’dür (Demir., 2005).

PVY, bitki virüs alemi içerisinde en geniş familya olan *Potyviriidae* familyasında *Potyvirus* cinsinde yer almaktadır. Virüs yaygın olarak patateslerde enfeksiyon yapmakla birlikte sebze tarımının yapıldığı bölgelerde önemli bir bitki patojenidir. Ürünün kalite ve verimini % 80’e kadar düşürmektedir. (Hamalainen ve ark., 1997). PVY genel olarak, aralarında *Solanaceae*, *Chenopodiaceae*, *Amaranthaceae*, *Compositae*, *Leguminoceae* gibi ekonomik öneme sahip ürünler başta olmak üzere 27 familya içerisinde yer alan 69 cinsin, yaklaşık 340 türünü hastalandırabilmektedir (Boonham ve Barker, 1998).

PVY, 73 farklı yaprakbiti türü ile bütün dünyaya yayılmıştır (Varveri, 2000). Virüsün, taşınmasında vektörlerin etkili olması, çok sayıda konukçusunun bulunması, etkili kimyasalların olmaması virüs enfeksiyonlarına karşı mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Virüslerle mücadelede dayanıklı çeşitlerin kullanılması ekonomik, çevreye duyarlı ve etkili yöntemdir.

Biber yetiştiriciliğinde PVY’nün enfeksiyonlarının kontrolü, biber gen kaynaklarında mevcut olan ve çok geniş kapsamlı çalışılmakta olan genetik dayanıklılığın sağlanmasıyla mümkündür. “Patotip”, spesifik konukçu bir gen tarafından kontrol edilen viral ajanın alt türü olarak ifade edilmektedir (Hampton ve Provvidenti, 1992). *Capsicum annuum* genotiplerini enfekteleyen izolatlar, dayanıklılık allellerinin herhangi bir tanesini ($pvr2^+$) yitirdikleri durumda patotip (0) grubuna dahil olmaktadır. İzolatlardan $pvr2^1$ allelini taşıyan genotipleri enfekteleyenler patotip (0,1) olarak kabul edilmektedir. $pvr2^1$ ve $pvr2^2$ allellerini taşıyan genotipleri enfekteleyenler patotip (0,1,2) olarak gruplanmaktadır. Bu dayanıklılık allelleri birçok biber çeşidinde bulunmaktadır. PVY izolatlarının büyük bir çoğunluğu patotip (0) veya (0,1)’dir (Palloix ve ark., 1994b). Ancak patotip (0,1,2) laboratuvar koşullarında $pvr2^2$ dayanıklılık alleli taşıyan biberlere seri olarak yapılacak inokulasyonlarla belirlenebilmektedir.

Bu araştırmada 43 kırmızıbiber hattının, PVY'nün PVY(0), PVY(0,1), PVY(0,1,2) patotiplerinin enfeksiyonlarına reaksiyonları araştırılmıştır. Biber hatlarında, biyolojik yontemlerle PVY patotiplerinin çoğalması ve yayılmasını takiben oluşan simptomların gözlenmesi ve virüs akümüleyonunun PVY-spesifik poliklonal antiserumla serolojik olarak değerlendirilerek hassas ve dayanıklı hatların belirlenmesi ve reaksiyonları incelenen hatların değerlendirilmesine katkı sağlamıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Biber yetiştiriciliğinde verim ve kalite kaybında viral etmenlerin ayrı bir önemi vardır. Virüslere karşı doğrudan kimyasal mücadelenin olmaması, mücadele yöntemlerinin üreticiler tarafından yeterince bilinmemesi, bazı virüslerin vektörlerle taşınıyor olması, virüse dayanıklı çeşitlerin çok az olması, virüs enfeksiyonlarından kaynaklanan verim ve kalite kayıplarının artmasına neden olmaktadır. Biber yetiştirilen alanlarda fitopatolojik sorunlara yönelik yapılan araştırmalar derinleştikçe, ekonomik zararı yüksek birçok viral etmenin varlığı da ortaya konmaktadır. Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada PVY enfeksiyonları rapor edilmiştir.

2.1. Dünya'daki Çalışmalar

PVY tek iplikli ve pozitif polariteli bir RNA virüsüdür (Jacquot ve ark., 2005). Virüs partikülü 740 x 11 nm ölçülerinde ipliksi, sarmal yapıda %5,4–6,4 nükleik asit ve %93,6–94,6 protein içermektedir. Genomu tek parçalı 10,4 kb uzunluğundadır (Boonham ve Barker, 1998). PVY genomu yaklaşık olarak 9700 bazlık RNA'dan oluşmakta ve bu RNA'nın 3' ucundaki, kılıf proteini kodlayan bölgenin aminoasit yada nükleotid dizisini içeren ve 3' ucuna çevrilmeyen bölgenin nükleotid sekansını içeren baz dizisi, türlerin ayırımında kullanılmaktadır. Genomun 5' ucundaki sekans daha büyüktür ve bu sekans da patotiplerin ayırımında kullanılmaktadır (Spetz ve ark., 2003).

Son yıllarda virüslerle mücadelede bitkilerdeki genetik dayanıklılık mekanizmasının araştırılması üzerinde yoğunlaşmıştır. Potyviruslere karşı resesif dayanıklılık, bitkideki dayanıklılık faktörü "eIF4E" (ökaryotik translasyon başlangıç faktörü 4E) (Robaglia ve Caranta, 2006) yokluğunda meydana gelmektedir. Bu faktörün yokluğunda veya mutasyona uğramasıyla VPg ile fiziksel interaksiyon gerçekleşmemekte ve bitkideki dayanıklılık ortaya çıkmaktadır (Kang ve ark., 2005; Maule ve ark., 2007).

Biberde mevcut ve ıslah çalışmalarında sıklıkla kullanılan diğer dayanıklılık mekanizması ise dominant dayanıklılık allelerinin bulunduğu P10 kromozomunda, *Pvr4* lokusundan gelmektedir. *Pvr4* dayanıklılık mekanizması erken dönemde kotiledon yapraklara yapılacak inokulasyon veya yüksek inokulum kaynaklarının bulunması durumunda aşı indekslemeyle ortaya çıkacak olan aşırı duyarlılık reaksiyonlarıyla yakından ilgilidir. Son 20 yıldır açık arazide hiçbir PVY izolatının *Pvr4* dayanıklılığı bulunan bitkileri hastalandırmadığı bilinmektedir. Spesifik monoklonal antibadiler

kullanılarak yapılan ELISA testi çalışmaları, PVY ırklarının teşhisinde güvenilir sonuçlar vermemektedir (Gugerli ve Gehriger, 1980; Gugerli ve Fries, 1983). RT-PCR bu amaçla kullanılabilecek en güçlü alternatif yöntem olarak kabul edilmektedir (Lorenzen ve ark., 2006).

Gugerli ve Gehriger, (1980) patates yumrularında dormansinin kırılmasından sonra, ELISA yöntemi kullanarak PVY ve Patates yaprak kıvrıcıklığı virüsü (PLRV)'nü araştırmışlardır. Dormant haldeki yumrulara PLRV'nün güvenilir olarak tespit edilirken, PVY için dormansinin kırılmasından sonra tespit edilebildiğini bildirmiştir.

Kostiw, (1984) PVY ve Patates M virüsü (PVM)'nün, *Aphis nasturtii* ve *Myzus persicae* tarafından taşınmasında yüksek ve düşük sıcaklığın etkili olduğunu belirtmiştir. Patates bitkisinde *M. persicae* ve *A. gossypii*'nin, PVY'nün (%63,9-80) ve PLRV'nün (%47,6-90)' etkili bir şekilde taşınmaktadır (Biswas ve ark., 2000). Tunus'ta bitki virüslerinin bazılarının *A. gossypii*, *A. craccivora*, *M. persicae* ve *M. euphorbiae* yaprakbiti vektörlerinde; patates, biber ve domates bitkilerinde CMV, TEV, AMV, PVY ve PLRV virüslerini DAS-ELISA testi ile tespit edilmiştir.

Caranta ve ark., (1997) *Pvr4* genini biber genomunda haritalamış ve gen ile bağlantı halinde olan bir işaretleyiciyi yayınlamıştır. *Pvr4* geni Meksika orijinli CM344 biber genotipi tohumdan belirlemişlerdir ve bilinen PVY'nün patotiplerine karşı dominant dayanıklılık sağlamaktadır.

Edwardson ve Christie, (1997) birçok kültür bitkisinde özellikle de Solanaceae familyasında yer alan domates, patates, patlıcan ve diğer bitkilerde hastalığa neden olan çok sayıda virüsün aynı zamanda biberde de hastalığa neden olduğu ve farklı şekillerde karşılıklı taşınmaların gerçekleşebileceğini belirtmiştir.

Singh ve Singh, (1997) enfekteli dokularda virüslerin yoğunlukları bitki türüne, çeşidine, bitki aksamına, örneklerin alındığı zamana, enfeksiyon zamanına, virüse ve virüs ırkına bağlı olarak değişim gösterdiğini, yapmış olduğu çalışmada farklı çeşitlere ait patates yumrularında, PVY (0)'in yoğunlukları arasında 128 kat farklılığın oluştuğunu bildirmişlerdir.

Lindhout, (2002) genel kural olarak, potyviruslere dayanıklılık lokusu "*pvr*" sembolü ile ifade edilmekte ve bunu teşhis edilmiş oldukları kronolojik sıraya göre de lokus üzerinde üst bilgi olarak gösterilmektedir. Bu lokuslardaki dominant duyarlılık geni

ise üst bilgi olarak '+' işaretini taşımaktadır. Altı lokus (*pvr1*, *pvr2*, *pvr3*, *Pvr4*, *pvr5*, *pvr6*) teşhis edilmiştir.

Mehle ve ark., (2004) PVY'nün patotipleri, domates, biber ve tütünde hafif beneklenmelere neden olmaktadır. PVY enfeksiyonu tütün bitkisinin verimini %30'a kadar azaltabilir. Tütün damar nekrozu hastalığına neden olan PVY^N patotipi, ürünün tamamen kaybına neden olur. Biber ve domateste de önemli hasar ve kayıplara neden olur. PVY^N'nün patates yumrusunda halkasal nekrotik lekelere neden olduğunu bildirmiştir.

Ayme ve ark., (2006) PVY'nün, VPg'nda bulunan beş farklı aminoasit yapınının, biberdeki *pvr2*³ dayanıklılık genindeki virülanslıktan bağımsız olarak sorumlu olduğunu belirtmiştir. İlk inokulasyondan sonra bitkilerin %37'sinde dayanıklılığın yıkıldığını ve *pvr2*³ de dayanıklılığın sürekliliğinin az olduğunu ifade etmişleridir.

Ayme ve ark., (2007) virülanslığı farklı PVY izolatlarında, viral protein geninin (VPg) merkez kısmında, tek veya kombinasyonlar halinde farklı 11 aminoasit dizilişini tespit etmişlerdir. Enfektif bir PVY klonundan edinilen bu bilgiye göre, mutantlardaki virülanslık durumu, *pvr2* lokusundaki farklı allelleri taşıyan dört farklı biber genotipinin inoküle edilmesiyle değerlendirilmiştir. Mutasyonlar, virülanslık üzerine karışık etkiler yapmışlardır. Bunun yansıra çeşitli mutantlar, doğada bilinmeyen yeni virülanslıklar göstermiştir. Bitkiler üzerinde bu tür virülanslık çalışmaları, *pvr2* allelleri üzerinde dayanıklılığın sürekliliği düzeylerini anlamaya yardımcı olmaktadır.

Janzac ve ark., (2009) CM334 genotipinde bulunan *Pvr4* geninin, bitki virüslerine dayanıklılık genleri arasında en geniş dayanıklılık spektrumuna sahip gen olduğunu belirtmektedir. Bu gen bütün bilinen PVY patotiplerine, PMMoV ve *Biber sarı mozaik virüsü*ne (PepYMV) karşı dayanıklılık etkinliğini araştırmak için kullanılmıştır. CM 334'den elde edilen ve *Pvr4* genini taşıyan W4 hattının, *Peru domates mozaik virüsü* ve *Biber şiddetli mozaik virüsü* 'ne karşı dayanıklı, ancak *Biber damar beneklenme virüsü* ve TEV'ne karşı dayanıklı olmadığını göstermiştir. Dayanıklılığı tipik olmayan bir durum olduğu gözlenmiş olup, W4 hattının virüse göre değişkenlik göstererek aşırı duyarlılık reaksiyonu verebileceğini bildirmiştir.

Kaliciak ve Syller, (2009) PVY'nün, dünya patates üretimini ekonomik olarak tehdit etmekle birlikte diğer pek çok kültür bitkisinde (biber, tütün ve domates) önemli zararlar yaptığı rapor etmişlerdir. PVY'nün, kontrollü şartlarda enfektelenen yabancı

otlardan *Erodium cicutarium*, *Geranium pusillum*, *Lactuca serriola*, *Lamium purpureum* bitkilerinde varlığını ELISA yöntemi ile tespit etmişlerdir.

2.2. Türkiye'deki Çalışmalar

Yılmaz ve Davis, (1985) Çukurova bölgesinde açık alanlarda yetiştirilen biberlerde, CMV, TMV ve PVY'nün enfeksiyonlarını tespit etmişlerdir. Bu bölgedeki biber yetiştiriciliğinde ekonomik kayıpların nedeni olarak, sözü edilen virüslere duyarlı çeşitlerin yetiştirilmesi olduğunu vurgulamıştır.

Palloix ve ark., (1994) taze biber üretimi yapan Demre'den Adana'ya kadar olan bölgede cam seralarda veya plastik tünellerde, açık alanlarda kurutmalık biber yetiştiriciliği yapılan Kahramanmaraş'da ve salçalık biber yetiştirilen Karaisalı yöresinde, TMV, PepMoV, PVY, TEV ve CMV için surveyler yapmıştır. Survey sonuçları simptomatolojik gözlemlerin yanı sıra, DAS-ELISA ve elektron mikroskobu yöntemleriyle kombine edilmiştir. Virüs enfeksiyonları pek çok bölgede, özellikle Karaisalı havzasında yoğun olarak tespit edilirken, Kahramanmaraş yöresinde bu oranın az olduğunu tespit etmiştir. Açık alanda biber yetiştiriciliğinde önemli yere sahip olan Çukurova Bölgesi'ndeki biberlerin; CMV, TMV, PVY enfeksiyonlarına duyarlı olduklarını ve bu virüslerin ekonomik kayıplara neden olduğunu bildirmiştir.

Ekbiç ve ark., (1997) biberlerde zarar meydana getiren 43 farklı virüs olduğunu ve bunlardan CMV'nün Türkiye'de biber yetiştirilen alanlarda en çok rastlanan virüs olduğu, bunu sırasıyla PVY, TEV, TMV ve PMMoV'nün takip ettiğini, Türkiye'de PVY'nin 0 ve 1 patotiplerinin bulunduğunu bildirilmiştir.

Gümüş ve ark., (2001) tohum üreten ve pazarlayan ticari firmalardan temin ettikleri bezelye, biber, domates, fasulye, hıyar, kabak ve marul tohumlarında, tohumla taşınan virüsleri serolojik yollarla tespit etmek için çalışma yapmışlardır. Araştırmadan alınan sonuçlar biber tohum örneklerinin % 84,09'nun CMV, % 50'sinin ToMV ile enfekteli olduğunu bildirmiştir.

Bostan ve Dursun, (2002) Kemaliye ve Yusufeli ilçelerindeki biber üretim alanlarındaki yaptıkları çalışmada Kemaliye ilçesinden alınan 30 örnekten 11'inin PVY, 7'sinin TMV, 1'inin TMV+PVY, Yusufeli ilçesinden alınan 15 örnekten 6'sının PVY, 3'ünün ise TMV ile enfekteli olduğunu bildirmişlerdir. Her iki ilçedeki biber tarlalarında neredeyse bitkilerin tamamının virüslere özgü semptom sergilediklerini gözlemişlerdir.

Mikro klima özelliği gösteren bu ilçelerdeki bahçelerde biber, domates, hıyar, fasulye, patates, marul ve ıspanak ağırlıklı olarak münavebeli ve yan yana yetiştirildiğini, bu durumda PVY'nün patatesten bibere, biberden de patates bitkisine vektörlerle taşınarak enfeksiyona neden olabileceğini bildirmişlerdir.

Arlı-Sökmen ve ark., (2005) Samsun'da yetiştirilen biberlerde ve yabancı otlarda altı virüs (AMV, CMV, PVY, ToMV, TMV, TSWV) için araştırma yapmışlardır. Biberlerde ve yabancı otlarda yapılan serolojik testler sonucunda, örneklerin en az bir veya iki virüs enfeksiyonu taşıdığını belirtmiştir. Karışık enfeksiyon kombinasyonlarında da PVY sıklıkla tespit edilen virüs olduğunu bildirmiştir.

Buzkan ve ark., (2006) biber yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapılan Güneydoğu (Şanlıurfa, Gaziantep) ve Doğu Akdeniz (Kahramanmaraş, Hatay) bölgelerinde biberde yaprakbitleriyle taşınan virüslerin (CMV, AMV, PVX, PVY, PMMoV ve TEV) bazılarının yayılımlarını tespit etmek amacıyla çalışma yapmışlardır. DAS-ELISA testi ile örneklerin % 64,8'inin bir veya daha fazla virüsle enfekteli olduğunu belirlemiştir. PVY biberde en yaygın virüs olarak bulunurken bunu PVX, AMV, TEV, PMMoV ve CMV enfeksiyonları takip etmiştir. PMMoV, örnek alınan bütün bölgelerde ilk kez tespit etmişlerdir.

Çelik ve ark., (2012) Antalya ilinde örtü altında yoğun olarak üretimi yapılan bazı ticari biber çeşitlerinin, PVY(0) patotipine reaksiyonlarını belirlemek amacıyla mekanik inokulasyon yöntemi ile testlemeye almışlar. Otuz adet ticari biber çeşidinden, 29 adetinde yapraklarda renk açılması, mozaik, kıvrılma, şekil bozukluğu ve bitkinin genel görünümünde bodurlaşma belirtileri gözlemlenmiştir. Yapılan gözlem ve ELISA testlerine göre bu çeşitlerin PVY(0) patotipine hassas olduğunu bildirmişlerdir. PVY ve CMV daha çok meyve bahçelerine yakın, etrafında çok sayıda yabancı ot bulunan seralarda rastlandığını, sera içerisinde ise daha çok kenar sıralarda ve pencere açıklıklarına yakın yerlerde görüldüğünü, kültür bitkilerinde virüs hastalıklarının önlenmesinde yabancı ot kontrolünün önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Çelik ve ark., (2013) PVY'ne dayanıklı hatlar geliştirmek amacıyla ıslah çalışmasında *Pvr4* lokusuna sahip CM344'ü baba, duyarlı Serademre 8 (SD8) çeşidi ana olarak kullanmış ve elde edilen F₁ bitkilerini PVY(0) patotipiyle inoküle etmişlerdir. Sonuçlar CAPS moleküler işaretleyicilerle testlenmiştir. Testleme sonucu *Pvr4* geni bakımından heterozigot durumda bulunan bitkiler arasında geriye melezleme yapılmış, çalışmada dayanıklı GMF1 bitkileri baba, SD8 bitkileri ana olarak kullanılmıştır. Geriye

melezleme çalışmalarından elde edilen jenerasyonlardan, fide aşamasında izole edilen DNA'lardan dayanıklı genotipler CAPS markör ile taranmış, MAS ile dayanıklı genleri taşıyan bireyler seçilmiştir. Bu şekilde 3 geri melezleme yapılmış ve her melez sonrası mekanik inokulasyonla ve moleküler olarak testlemeler yapılmıştır. Yapılan alışma sonunda PVY (0) patotipine dayanıklı genotipler geliştirmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Araştırmada kullanılan 43 kırmızıbiber hattı Doğu Akdeniz Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma İstasyonu Müdürlüğü (Kahramanmaraş)'nde patojene dayanıklı hatlar geliştirmek amacıyla yapılan ıslah çalışmalarında geliştirilmiştir. Hatların 21 adedi Sena çeşidi ile C15 (KM2-11 x CM334) yarı yol materyalinin iki jenerasyon geriye melezlenip kendilenecek F4 kademesine getirilen hatlardır. Diğer 22 hat ise Sena çeşidi ile P45 (KM2-11 x PBC178) yarı yol materyalinin iki jenerasyon geriye melezlenip kendilenecek F4 kademesine getirilen hatlardır. Yarı yol materyallerinin geliştirilmesinde kullanılan CM334, PVY'ne dayanıklılık sağlayan *pvr* lokuslarına sahiptir. Denemede dayanıklı kontrol olarak CM334, hassas kontrol olarak Serademre 8 çeşidi kullanılmıştır.

Araştırmada kullanılan PVY patotipleri (0), (0,1) ve (0,1,2)'dir. Yolo Wonder, Yolo Y, Florida VR2 ve W4 biber genotipleri PVY patotiplerini kontrol etmek amacıyla pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Susuz kalsiyüm klorür ortamında kurutulmuş patotipler, INRA (Ulusal Araştırma Enstitüsü), Fransa'dan temin edilmiş ve *Nicotiana tabacum* L. "Samsun" tütün bitkisinde çoğaltılmıştır.

ELISA testinde kullanılan PVY poliklonal antiserumu Bioreba (Fransa) üretici firmasından temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. Biber genotiplerinin PVY patotiplerine reaksiyonları ve bulundurdıkları *pvr* lokusları

Genotipler	Patotipler			<i>pvr</i> lokusları
	(0)	(0,1)	(0,1,2)	
Yolo Wonder	H	H	H	<i>Pvr2</i> ⁺
Yolo Y	D	H	H	<i>Pvr2</i> ¹
Florida VR2	D	D	H	<i>pvr2</i> ²
W4	D	D	D	<i>pvr2</i> ⁺ , <i>Pvr4</i>

* D: Dayanıklı, H: Hassas

3.2. Metot

3.2.1. Fidelerin yetiştirilmesi

Biber hatlarının tohumları 3:1 (hacim/hacim) torf: perlit ortamına ekilip, iklim odasında (24°C sıcaklık, 16 saat fotoperiyot, 3000 lux ışık yoğunluğu, %60 oransal nem)

tutulmuştur. Her hat ve kontrol bitkisinden 27 adet fide yetiştirilmiştir. Yolo Wonder, Yolo Y, Florida VR2 ve W4 biber genotiplerinin her biri için 36 adet fide yetiştirilmiştir.

3.2.2. Biyolojik indeksleme

Farklı patojeniteye sahip PVY patotipleri (0), (0,1) ve (0,1,2) denemeye alınan biber hatlarına ve referans bitkilere mekanik inokulasyon yöntemi ile inokule edilmiştir. İnokulasyon sonrasında, biber hatları ile PVY patotipleri arasındaki ilişki, bitkilerde meydana gelen belirtilerin izlenmesi ve serolojik testlerle (DAS-ELISA) değerlendirilmiştir. Belirtiler gözlenmesi ve ELISA testleri haftalık olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Mekanik inokulasyon

PVY patotiplerini mekanik olarak biber hatlarına ve referans bitkilerine inokulasyonu, biber fidelerinin ilk gerçek yapraklarının çıkışını takiben kotiledon yapraklarına yapılmıştır (Moury ve ark., 2004). Steril porselen havan içerisinde yaprak örneği (1 g), 4 hacim 0.03 M fosfat tamponu (pH 7.0) ve %2 (ağırlık/hacim) DIECA, 20 mg/ml aktif kömür ve 20 mg/ml karborandum içeren tampon ile ezilerek inokulum hazırlanmıştır. Hazırlanan inokulum, karborandum tozuyla kaplanmış olan biber fidelerinin kotiledon yapraklarına sürülmüştür (Şekil 3.1). Denemelerde dayanıklı CM 334 ve hassas Serademre 8 bitkileri kontrol bitkileri olarak kullanılmıştır. Bitkiler sera koşullarında bekletilmiş ve belirtiler gözlenmesi haftalık olarak yapılmıştır. Pozitif kontrollerde (hassas bitkiler) PVY patotiplerinin meydana getirmiş olduğu ilk belirtiler gözlenmesiyle birlikte, biber hatlarında virüs akümüasyonu DAS-ELISA ile haftalık olarak testlenmiştir.



Şekil 3.1. Mekanik inokulasyon yapılmış biber fidesi

3.2.4. DAS-ELISA testi (Double antibody-enzyme linked immunosorbent assay) (Legnani ve ark., 1995)

1. ELISA plakaları PVY poliklonal antiserumu üretici firmanın tavsiye ettiği sulandırma oranında (1:1000) kaplama tamponu (Ek A.1) ile seyreltilmiş ve 100 µl/çukur olacak şekilde kaplanmıştır. PVY poliklonal antiserumla kaplanan plakalar 37°C'de 2 saat süreyle, nem çemberi oluşturulmuş saklama kaplarında bekletilmiştir.

2. İnkübasyon sonunda plakalar yıkama tamponuyla (Ek A.4), 3 kez, 3 dk. arayla yıkanmış ve iyice kurulanmıştır.

3. Yaprak örnekleri (100 mg) ezme tamponu (Ek A.2) kullanılarak, (1:10, ağırlıklı/hacim) ezilmiş ve testlemede kullanılmaya kadar +4°C'de saklanmıştır. Ezme tamponuyla hazırlanmış örnekler iki tekerrürlü ve 100 µl/çukur olacak şekilde plakalara konulmuştur. Plakalar +4 °C'de bir gece (16 saat) bekletilmiştir.

4. Plakalar yıkama tamponuyla (2) numaralı aşamada belirtildiği şekilde yıkanmıştır.

5. Antiserum-enzim konjugasyonu üretici firmanın tavsiye ettiği oranlarda (1.1000), konjugat tamponu (Ek A.3) içinde seyreltilmiş ve 100 µl/çukur olacak şekilde çukurlara konulmuştur. Plakalar 37°C'de 2 saat süreyle nem çemberi oluşturulmuş saklama kaplarında bekletilmiştir.

6. Plakalar (2) numaralı aşamada belirtildiği şekilde yıkanmıştır.

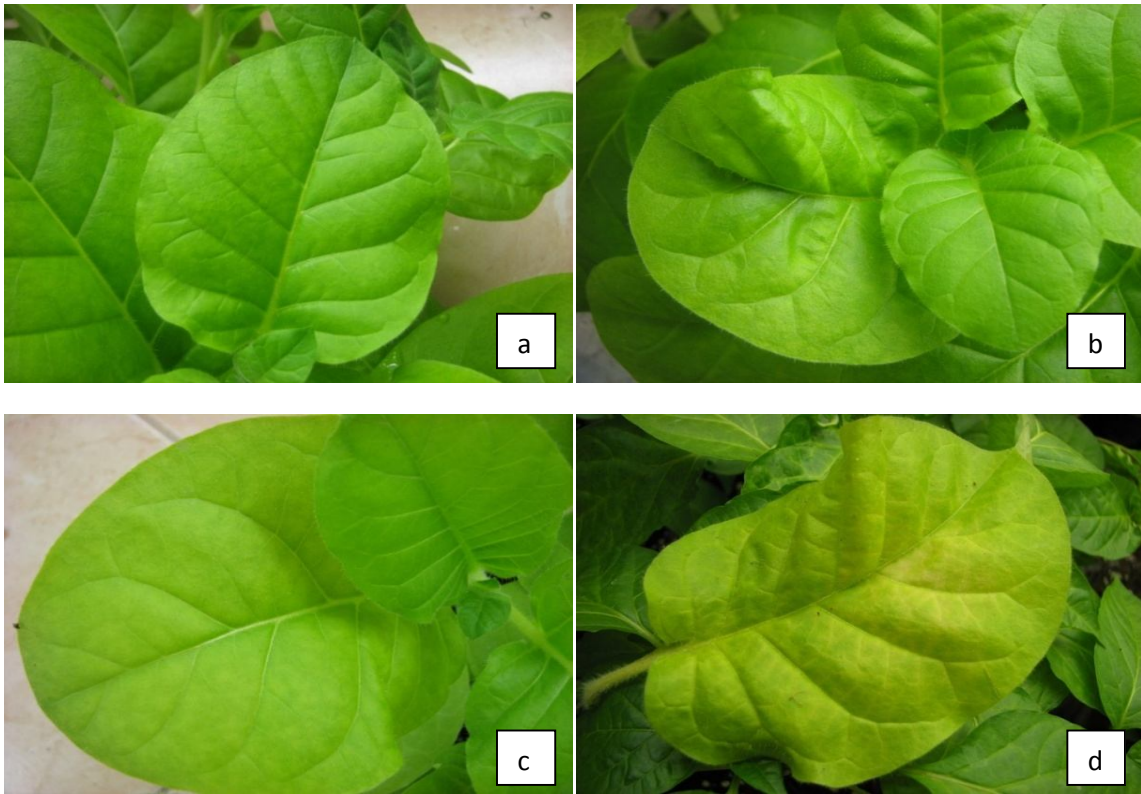
7. Substrat tamponu (Ek A.5) içine *p*-nitrophenly phosphate (1mg/ml) eklenmiş ve 100 µl/çukur olacak şekilde çukurlara konulmuştur. Plakalar ışık almayacak şekilde saklama kabında, oda sıcaklığında bekletilerek çukurlardaki renk değişimi izlenmiştir. Pozitif kontrollerde renk değişiminin gözlemlendiği ilk 30 dk. ve 60. dk. süre aralıklarında 405 nm dalga boyunda, ELISA plaka okuyucusunda (SIRIO) okumalar yapılmıştır. Negatif kontrollerde okunan O.D. değerlerinin üç katı veya daha fazlası pozitif olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Simptomatolojik Gözlemler

4.1.1. PVY patotiplerinin tütün bitkisinde oluşturduğu belirtiler

PVY'nün patotiplerini, çoğaltmak amacıyla *Nicotiana tabacum* L. " Samsun " tütün bitkisine mekanik inokulasyon yapılmıştır ve patotiplere göre oluşturdukları belirtiler (Şekil 4.1) gözlenmiştir. PVY (0) patotipi tütün bitkilerinde mozaik ve sarı lekeler (Şekil 4.1a) oluşturmuştur. PVY (0,1) patotipi, şekil bozukluğu (Şekil 4.1b), yapraklarda sarı leke belirtilerini oluşturmuştur. PVY (0,1,2) patotipi mozaik (Şekil 4.1c), yapraklarda sararma (Şekil 4.1d) ve dökülmelere sebep olmuştur.



Şekil 4.1. PVY patotiplerinin tütün bitkisinde oluşturduğu belirtiler a:Yapraklarda mozaik b: Yapraklarda şekil bozukluğu c: Yapraklarda mozaik ve sarı lekeler d: Yapraklarda sararma

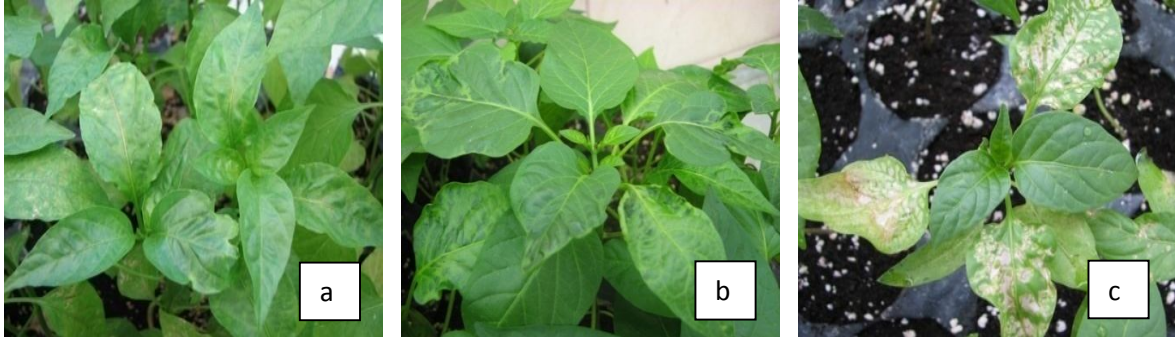
4.1.2. PVY patotiplerinin biber genotiplerinde oluşturduğu belirtiler

Patotiplerle spesifik reaksiyona giren genotiplere (Yolo Wonder, Yolo Y, Florida VR2, W4) (patotip / 10 adet bitki) mekanik inokulasyon yapılmış, patotipler biber genotiplerinde farklı belirtiler (Çizelge 4.1) oluşturmuştur.

Çizelge 4.1. PVY izolatlarının, patotip ayırım setinde bulunan referans biber bitkilerde oluşturduğu simptomlar

Genotip	PVY Patotipleri		
	PVY (0)	PVY (0,1)	PVY (0,1,2)
Yolo Wonder	Mozaik, kloroz	Mozaik, renk ve şekil bozukluğu renk açılması	Nekroz
Yolo Y	Simptom yok	Mozaik, şekil bozukluğu	Mozaik, şekil bozukluğu, damar nekrozu
Florida VR2	Simptom yok	Simptom yok	Mozaik, şekil bozukluğu, damar klorozu
W4	Simptom yok	Simptom yok	Simptom yok

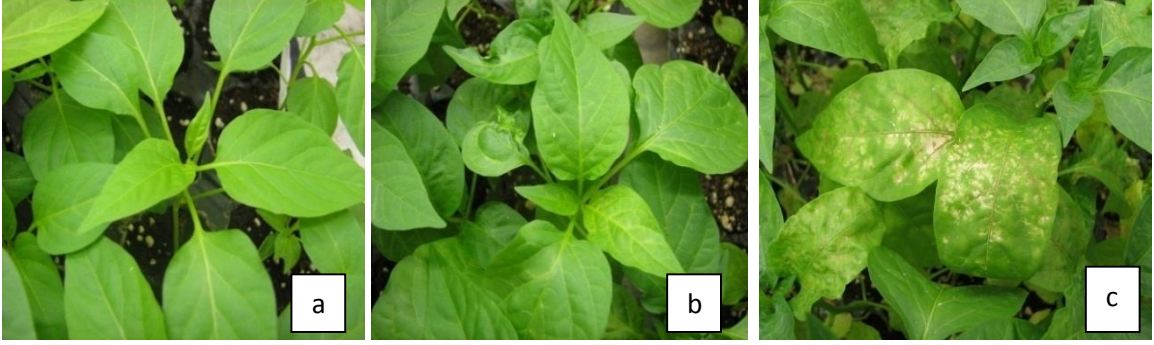
W4 genotipinde genel olarak PVY'nün bilinen patotiplerine dayanıklı ve simptom meydana gelmemiştir. Yolo Wonder genotipinde, mozaik ve kloroz simptomuna PVY'nün (0) patotipi, buna ilaveten yapraklarda renk ve şekil bozukluğuna (0,1) patotipi, ayrıca yaprak nekrozuna (0,1,2) patotipi neden olmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4.2. PVY izolatlarının Yolo Wonder genotipinde oluşturduğu simptomlar a: PVY(0); mozaik, kloroz, b: PVY (0,1); mozaik, şekil bozukluğu ve renk açılması, c: PVY (0,1,2); mozaik, şekil bozukluğu ve nekroz

Yolo Wonder genotipinde, PVY izolatlarına dayanıklılık lokusu bulunmamaktadır ve her üç patotipe karşı hassastır.

PVY (0) patotipi bitkilerde, yaprakta mozaik ve kloroz simptomları (Şekil 4.1a), PVY (0,1) patotipi ilk dönemde yaprak yüzeyinde deformasyon, yapraklarda içe doğru kıvrılma, ilerleyen dönemlerde mozaik, renk açılması ve kaşık formu simptomları (Şekil4.1b) oluşturmuştur. PVY (0,1,2) patotipi ise yaprak yüzeyinde deformasyon, damar bantlaşması ve ilerleyen dönemlerde simptom şiddeti artarak nekrozlara (Şekil 4.1c), yaprak dökülmesine neden olmuştur.



Şekil 4.3. PVY izolatlarının Yolo Y genotipinde, oluşturduğu semptomlar. a: PVY(0); semptom yok, b: PVY(0,1); mozaik, şekil bozukluğu, c: PVY(0,1,2); nekroz

Yolo Y genotipinde, PVY(0) semptom oluşturmamıştır. PVY(0,1) patotipi yapraklarda mozaik, şekilbozukluğu (Şekil 4.3a) semptomları oluşturmuştur. PVY(0,1,2) patotipi, yapraklarda mozaik, şekil bozukluğu, damarlarda kahverengi nekrozlara (Şekil 4.3b) neden olmuştur.



Şekil 4.4. PVY (0,1,2) izolatının Florida VR2 genotipinde yapraklarda meydana getirdiği şekil bozukluğu, damar bantlaşması ve kloroz semptomları

Florida VR2 genotipinde, PVY (0) ile PVY(0,1) patotiplerine dayanıklılık özelliği bulunduğu için, bu genotipte iki patotipten kaynaklı semptom meydana gelmemiştir. PVY (0,1,2) patotipi yapraklarda şekil bozukluğu, damar bantlaşması ve kloroz semptomlarına neden olmuştur (Şekil 4.4).

PVY patotiplerinin mekanik olarak inoküle edildiği Yolo Wonder, Yolo Y, Florida VR2 ve W4 genotiplerinden alınan semptomatolojik ve serolojik sonuçlar birbirini destekler nitelikte olmuştur. ELISA testlerine göre Yolo Wonder genotipinde, PVY'nün bütün patotiplerinin enfeksiyonu pozitif değer vermiştir. Yolo Y genotipi, PVY (0,1) ve (0,1,2) patotiplerine, Florida VR2 genotipi ise PVY (0,1,2) patotipine pozitif reaksiyon

vermiştir W4 genotipi ise tüm patotiplere direnç göstermiş ve ELISA okumaları negatif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. PVY patotiplerinin Yolo Wonder, Yolo Y, Florida VR2 ve W4 genotiplerine inokulasyonu sonrası ELISA testi O.D. (405 nm) değerleri

	PVY (0)	PVY (0,1)	PVY (0,1,2)
Yolo Wonder	0,175 H	0,191 H	0,389 H
Yolo Y	0,023 D	0,156 H	0,369 H
Florida VR2	0,006 D	0,018 D	0,174 H
W4	0,011 D	0,020 D	0,009 D
Kontrol (-)	0,015	0,010	0,014
Kontrol (+)	0,355	0,438	0,378

*D: Dayanıklı; H: Hassas

4.1.3. PVY patotiplerinin biber hatlarında oluşturduğu belirtiler

PVY patotipleriyle biber hatlarına yapılan mekanik inokulasyonu takiben 8-10 gün içerisinde ilk belirtiler, kontrol bitkilerinde ve patotiplere yüksek duyarlılık gösteren hatlarda belirlemeye başlamıştır. İlk belirtiler yaprak yüzeyinde deformasyon, yapraklarda içe doğru kıvrılma şeklinde oluşmuştur. Üçüncü haftadan sonra izolatların oluşturduğu belirtiler (Çizelge 4.3) farklılıklar göstermeye başlamıştır.



Şekil 4.5. Biber hatlarında, PVY(0,1) ve PVY(0,1,2) patotiplerinin, mekanik inokulasyondan bir ve iki hafta sonra oluşan belirtiler a: Yaprak yüzeyinde deformasyon (1 hafta sonra) b: Yaprak yüzeyinde deformasyon ve yaprağın içe kıvrılması (iki hafta sonra) kabarcık

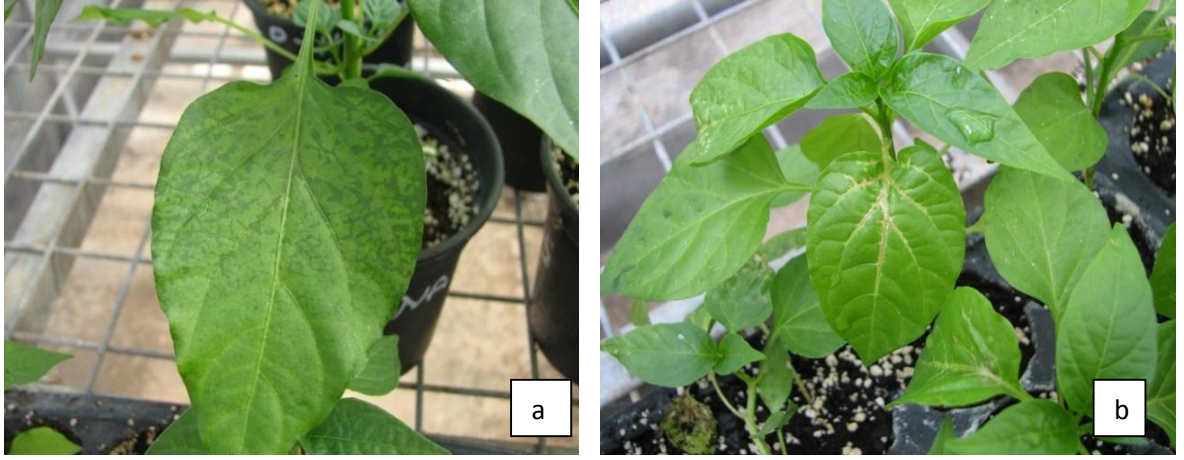
Çizelge 4.3. PVY patotiplerinin, kırmızıbiber hatlarında mekanik inokulasyon sonrası oluşturduğu belirtiler

Hat No	PVY(0)	PVY (0,1)	PVY (0,1,2)
1	Mozaik, damar nekrozu	Yaprak ve gövdede şekil bozukluğu	Mozaik, nekroz, gelişme geriliği
2	Mozaik, damar nekrozu	Kıvrılma, renk açılması, şekil bozukluğu	Mozaik, yaprak nekrozu
3	Mozaik, şekil bozukluğu, damar nekrozu	Yaprak ve gövdede şekil bozukluğu	Yaprak yüzey deformasyonu, yaprak nekrozu
4	Simptom yok	Renk açılması, yapraklarda şekil bozukluğu	Mozaik
6	Mozaik	Renk açılması, yapraklarda şekil bozukluğu	Mozaik, renk açılması
8	Simptom yok	Renk açılması, yapraklarda şekil bozukluğu	Mozaik
11	Mozaik	Renk açılması, yapraklarda şekil bozukluğu	Yaprak yüzey deformasyonu, renk açılması
15	Mozaik, damar nekrozu, kloroz	Renk açılması, yapraklarda şekil bozukluğu	Mozaik, yaprak yüzey deformasyonu, nekroz
16	Mozaik, damar nekrozu, kloroz, kıvrılma	Renk açılması,	Mozaik nekroz, bitki gelişiminde gerileme
23	Mozaik, damar nekrozu, kloroz	Mozaik, yaprak ve gövdede şekil bozukluğu	Yaprak yüzeyinde deformasyon, kıvrılma, nekroz
25	Mozaik, damar nekrozu	Yaprak ve gövdede şekil bozukluğu, sararma	Yaprak yüzeyinde deformasyon, nekroz, bitki gelişiminde gerileme
27	Mozaik	Renk açılması	Mozaik, renk açılması
28	Mozaik, damar nekrozu	Yaprak ve gövdede şekil bozukluğu, sararma	Mozaik, nekroz
30	Mozaik	Yaprak yüzeyinde deformasyon, şekil bozukluğu, ipliklenme	Mozaik, renk açılması
32	Damar nekrozu, damar bantlaşması	Şekil bozukluğu, renk açılması	Yaprak yüzeyinde deformasyon, mozaik, nekroz
33	Damar bantlaşması ve nekroz	Şekil bozukluğu, renk açılması	Mozaik, nekroz
37	Mozaik	Şekil bozukluğu, renk açılması	Yaprak yüzeyinde deformasyon, nekroz
38	Mozaik, damar nekrozu	Şekil bozukluğu, renk açılması	Nekroz
41	Mozaik	Şekil bozukluğu, sararma	Yaprak yüzeyinde deformasyon, mozaik
43	Damar bantlaşması, damar nekrozu	Şekil bozukluğu, sararma	Kıvrılma, nekroz
45	Mozaik	Şekil bozukluğu, sararma	Yaprak yüzeyinde deformasyon, mozaik, renk açılması
46	Damar nekrozu, içe kıvrılma	Şekil bozukluğu, renk açılması	Mozaik, renk açılması

Çizelge 4.3. PVY patotiplerinin, kırmızıbiber hatlarında mekanik inokulasyon sonrası oluşturduğu simptomlar (devam)

47	Simptom yok	Simptom yok	Simptom yok
48	Mozaik, damar nekrozu,	Şekil bozukluğu, renk açılması	Kloroz, nekroz
50	Mozaik, damar nekrozu	Şekil bozukluğu; renk açılması	Kloroz, nekroz
51	Simptom yok	Mozaik, şekil bozukluğu	Kloroz, nekroz
54	Mozaik, renk açılması	Yaprak yüzeyinde deformasyon, kıvrılma	Mozaik, nekroz
55	Yaprak yüzeyinde deformasyon, damar nekrozu, içe kıvrılma	Yaprak yüzeyinde deformasyon, kıvrılma, gövdede şekil bozukluğu	Mozaik, nekroz, bitki gelişiminde gerileme
58	Mozaik, nekroz	Yaprak yüzeyinde deformasyon, kıvrılma, gövdede şekil bozukluğu	Kabarcık, nekroz, bitki gelişiminde gerileme
59	Damar nekrozu	Yaprak yüzeyinde deformasyon, kıvrılma gövdede şekil bozukluğu	Mozaik, nekroz
61	Yaprak yüzeyinde deformasyon, damar nekrozu	Yaprak yüzeyinde deformasyon, kıvrılma, gövdede şekil bozukluğu	Yaprak yüzeyinde deformasyon, mozaik, nekroz
62	Simptom yok	Simptom yok	Simptom yok
63	Simptom yok	Simptom yok	Simptom yok
64	Mozaik, renk açılması	Yaprak yüzeyinde deformasyon, kıvrılma	Mozaik, nekroz
68	Nekroz, içe kıvrılma, bitki gelişiminde gerileme	Yaprak yüzeyinde deformasyon, kıvrılma	Nekroz
69	Yaprak yüzeyinde deformasyon, içe kıvrılma, damar nekrozu	Yaprak yüzeyinde deformasyon, kıvrılma	Şekil bozukluğu, nekroz
70	Mozaik, yaprak yüzeyinde deformasyon, damar nekrozu	Yaprak yüzeyinde deformasyon, kıvrılma, gövdede şekil bozukluğu	Şekil bozukluğu, nekroz
71	Mozaik, damar nekrozu, bitki gelişiminde gerileme	Yaprak ve gövdede şekil bozukluğu	Mozaik, nekroz
73	Mozaik, damar açılması, damar nekrozu	Mozaik, yaprak yüzeyinde deformasyon, gövdede şekil bozukluğu	Mozaik, kloroz, nekroz
74	Mozaik, damar nekrozu, yaprak renk açılması	Yaprak ve gövdede şekil bozukluğu	Nekroz
75	Damar nekrozu, bitki gelişiminde gerileme	Yaprak ve gövdede şekil bozukluğu	Mozaik, nekroz
76	Damar bantlaşması, damar nekrozu	Kıvrılma, bitki gelişiminde gerileme	Mozaik, nekroz
77	Damar bantlaşması, nekroz	Gövdede şekil bozukluğu	Mozaik, nekroz
SD8	Mozaik, damar nekrozu	Şekil bozukluğu; renk açılması	Mozaik, nekroz
CM334	Simptom yok	Simptom yok	Simptom yok

PVY (0) patotipi; bitki yapraklarında, mozaik, kloroz, damar nekrozu (Şekil 4.6) belirtilerine neden olmuştur. Altı hafta (4, 8, 47, 51, 62, 63) belirtiler oluşturmemiştir.



Şekil 4.6. PVY (0) patotipinin biber hatlarında oluşturduğu belirtiler a: Mozaik, b: Damar nekrozu

PVY (0,1,2) patotipi ile inokule edilen hatlarda yaprak yüzey deformasyonu, şekil bozukluğu, kloroz, nekroz, bitki gelişiminde gerileme ve yapraklarda dökülme belirtileri oluşmuştur (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. PVY (0,1,2) patotipinin biber hatlarında oluşturduğu belirtiler a: Yaprak yüzey deformasyonu ve şekil bozukluğu b: Yapraklarda nekroz

PVY (0,1,2) patotipi, hassas biber hatlarında mekanik inokulasyonu takiben birinci hafta sonunda yaprak yüzeyinde deformasyona, daha sonra kloroz ve nekrozlara neden olmuştur. Dördüncü hafta sonunda nekrozlu yapraklar dökülmüştür. Yeni oluşan yapraklarda hafif şiddette nekrozlar oluşmuş ve yaprak dökülmesi olmamıştır. Üç hafta (47,62, 63) belirtiler oluşmamıştır.

PVY (0,1) patotipi inokulasyonu yapılan hatlarda, mozaik, yaprak yüzeyinde deformasyon, yaprakların içe doğru kıvrılması (kaşık formu), yaprak ve gövdede şekil bozukluğu, yapraklarda genel sarılık (Şekil 4.8) belirtilerine neden olmuştur. Üç adet hatta (47, 62, 63) belirtiler oluşturmemiştir.

PVY (0,1) patotipi, mekanik inokulasyondan bir hafta sonra yapraklarda yüzey deformasyonu, ilerleyen dönemde yapraklarda içe kıvrılma, dördüncü haftadan sonra bitki gövdesinde şekil bozukluğu oluşturmuştur. PVY (0,1) patotipinin genel olarak hassas biber hatlarında meydana getirdiği tipik belirtilerini gövdede şekil bozukluğu, yaprak ve meyvelerde renk açılmalarıdır. Meyvelerdeki renk açılmaları meyvede boyuna şeritler halinde, yeşilden beyaza doğru olacak şekilde meydana gelmiştir. Üç hatta (47,62, 63), bu patotipin neden olduğu belirtiler gözlenmemiştir.



Şekil 4.8. PVY (0,1) patotipinin biber hatlarında oluşturduğu belirtiler; a: Yaprak yüzey deformasyonu, içe kıvrılma ve renk açılması b: Yaprak şekil bozukluğu c: Gövde şekil bozukluğu ve yapraklarda sararma d: Meyvelerde boyuna renk açılması

4.2. Serolojik Testler

Mekanik inokulasyondan sonra ilk semptomları takiben 3., 4. ve 7. hafta sonunda bitki örnekleriyle DAS-ELISA testi yapılmış ve okuma değerleri O.D. (405nm) incelenmiştir (Çizelge 4.4).

ELISA testi sonucunda 62, 63 numaralı hatlardan alınan örnekler, PVY'nün tüm patotiplerine negatif değerler vermiştir. Diğer hatlardan alınan örnekler ise farklı sonuçlar vermiştir. Aynı hatların PVY'nün patotiplerine [(0), (0,1), (0,1,2)] dayanıklı olduğu görülmektedir. Hatların 16 tanesinden alınan bütün örnekler pozitif değer vermiştir. 25 adet hattın alınan örnekler ise farklı sonuçlar vermiştir. Bu durum, farklı sonuçlar veren hatlara mekanik inokulasyonun iyi yapılmadığı veya bu hatlarda PVY'nün patotiplerine reaksiyonları yönünden açılımın devam ettiğini düşündürmektedir. Bu nedenle semptomatolojik ve serolojik değerlendirmeler sonucunda, 10 adet hat seçilmiş (4, 8, 11, 27, 41, 47, 51, 62, 63 ve 64 nolu hatlar), bu hatların PVY'nün patotiplerine reaksiyonları tam olarak belirlemek için ikinci bir deneme kurulmuştur.

Her hattın 27 fide yetiştirilmiş ve her patotip için 9 adet bitkiye mekanik inokulasyon yapılarak semptomatolojik ve serolojik olarak hatların reaksiyonları belirlenmiştir. Mekanik inokulasyondan üç hafta sonra uygulanan ELISA testinde negatif değer veren bitkilere ikinci kez mekanik inokulasyon ikinci kez tekrarlanmıştır.

Hatlarda, PVV patotipleri birinci denemedekine paralel semptomlar (Bkz. Çizelge 4.3) oluşturmuştur. Bunlardan 47, 62 ve 63 nolu hatlarda semptom oluşmamıştır. Mekanik inokulasyonun 3, 6 ve 7. haftalarında, her patotip için her hattın 5 adet bitkiden örnekler alınmış ve DAS-ELISA testi uygulanmıştır. Virüsün ELISA plakalarında meydana getirdikleri O.D.₄₀₅ değerleri (Çizelge 4.5) ve semptomatolojik gözlemlerle, üç adet hattın PVY'nün üç patotiplerine karşı dayanıklı olabileceği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4. PVY patotipleriyle inokule edilmiş biber hatlarından 3.,4., ve 7. haftalarda ELISA testinden alınan O.D. (450 nm) değerleri

HAT NO	PVY (0)			PVY (0,1)			PVY (0,1,2)		
	3.Hafta	4.Hafta	7. Hafta	3. Hafta	4. Hafta	7. Hafta	3. Hafta	4. Hafta	7. Hafta
1	0,013D		0,268H	0,648H		0,059H	0,204H		0,122H
2	0,046H		0,182H	0,199H		0,140H	0,215H	0,156H	0,140H
3	0,290H		0,252H	0,766H		0,055H	0,394H		0,165H
4	0,003D	0,123H	0,061D	0,652H		0,048D	0,387H	0,091H	0,112H
6	0,045H	0,207H	0,117H	0,027D		0,054H	0,390H	0,188H	0,231H
8	0,023D	0,008D	0,000D	0,826H	0,009D	0,065H	0,280H		0,168H
11	0,038D	0,017D	0,174H	0,640H		0,132H	0,129H	0,218H	0,138H
15	0,022D		0,282H	0,766H		0,086H	0,246H		0,047H
16	0,154H			0,024D		0,085H	0,519H		0,469H
23	0,075H			0,211H		0,073H	0,452H		0,466H
25	0,025D		0,161H	0,170H		0,156H	0,304H		0,631H
27	0,044H	0,005D	0,113H	0,688H	0,009D	0,085H	0,079H	0,096H	0,064H
28	0,078H			0,473H		0,088H	0,185H		0,229H
30	0,045H	0,194H	0,079H	0,018D		0,067H	0,207H	0,204H	0,196H
32	0,075H	0,003D	0,170H	0,003D	0,140H		0,515H	0,235H	0,153H
33	0,091H		0,234H	0,320H		0,100H	0,572H		0,167H
37			0,063D	0,747H		0,057H	0,253H		0,316H
38	0,117H		0,122H	0,122H		0,126H	0,235H		0,775H
41	0,041H	0,017D	0,395H	0,393H		0,083H	0,317H		0,234H
43	0,080H		0,265H	0,553H	0,203H	0,070H	0,100H		
45	0,016D	0,213H	0,212H	0,679H		0,070H	0,223H	0,019D	0,069H
46	0,150H	0,020D	0,192H	0,223H	0,150H	0,169H	0,063H	0,105H	0,033H
47	0,017D	0,204H	-0,025D	0,036H	0,006D	0,190H	0,191H	0,006D	0,047H
48	0,051H	0,209H	0,228H	0,577H		0,104H	0,093H		0,038H
50	0,230H		0,531H	0,411H			0,205H		0,082H
51	0,052H	0,003D	-0,050D	0,017D		0,193H	0,039D		0,002D
54	0,091H		0,216H	0,246H		0,168H	0,179H		0,021D
55	0,000D		0,323H	0,779H		0,077H	0,258H		0,613H
58	0,043H		0,458H	0,325H	0,229H	0,117H	0,484H		0,436H
59	0,025D			0,196H		0,207H	0,200H		0,497H
61	0,062H		0,268H	0,287H		0,142H	-0,023D		0,073H
62	0,023D	0,006D	-0,033D	-0,026D		0,014D	-0,009D		0,003D
63	0,038D	0,017D	-0,020D	-0,010D		0,020D	-0,023D		0,019D
64	0,063H	0,003D	0,077H	0,594H	0,074H	0,124H	0,263H	0,005D	0,078H
68	0,036D	0,117H	0,141H	0,267H	0,207H	0,099H	0,175H	0,143H	0,351H
69	0,054H			0,029D	0,324H	0,107H	0,290H		0,622H
70	0,066H		0,276H	0,257H		0,186H	0,094H		0,088H
71	0,040H		0,110H	0,218H			0,170H		0,176H
73	0,052H			0,250H		0,075H	0,297H		0,555H
74	0,046H		0,017D	0,544H		0,107H	0,310H		0,095H
75	0,053H			0,391H		0,098H	0,113H		0,042H
76	0,046H	0,023D	0,595H	0,614H		0,064H	0,361H		0,252H
77	0,052H			0,555H	0,190H	0,113H	0,505H		0,085H
(-)	0,013	0,009	0,021	0,010	0,005	0,016	0,014	0,011	0,007
(+)	0,428	0,182	0,396	0,580	0,356	0,378	0,386	0,327	0,422

*D: Dayanıklı, H: Hassas

Çizelge 4.5. Seçilen biber hatlarında 3., 6.,ve 7. haftalarda PVY patotipleri için yapılan ELISA testinden alınan O.D. (405 nm) değerleri

Hatlar	PVY (0)			PVY (0,1)			PVY (0,1,2)					
	Bitki No	3. Hafta	6. Hafta	7. Hafta	Bitki No	3. Hafta	6. Hafta	7. Hafta	Bitki No	3. Hafta	6. Hafta	7. Hafta
4	1	0,011D	0,243H	0,403H	1	0,167H	0,403H	0,224H	3	0,177H	0,291H	0,504H
	2	0,006D	0,259H	0,409H	2	0,183H	0,173H	0,276H	4	0,289H	0,277H	0,415H
	3	0,006D	0,320H	0,307H	3	0,104H	0,105H	0,103H	6	0,240H	0,256H	0,513H
	4	0,032D	0,207H	0,512H	4	0,067H	0,167H	0,251H	8	0,175H	0,252H	0,289H
	5	0,024D	0,201H	0,462H	9	0,216H	0,192H	0,357H	9	0,116H	0,199H	0,493H
8	1	0,028D	0,091H	0,264H	1	0,133H	0,168H	0,163H	2	0,077H	0,189H	0,351H
	3	0,008D	0,113H	0,182H	2	0,095H	0,055H	0,176H	5	0,096H	0,206H	0,414H
	4	0,003D	0,282H	0,426H	3	0,416H	0,018D	0,257H	6	0,242H	0,196H	0,546H
	5	0,012D	0,289H	0,443H	5	0,306H	0,352H	0,270H	7	0,225H	0,356H	0,409H
	6	0,008D	0,369H	0,558H	6	0,219H	0,226H	0,331H	9	0,082H	0,268H	0,379H
11	3	0,012D	0,234H	0,477H	1	0,275H	0,170H	0,155H	1	0,130H	0,182H	0,371H
	4	0,037D	0,204H	0,349H	3	0,156H	0,162H	0,300H	4	0,189H	0,342H	0,382H
	5	0,026D	0,428H	0,542H	4	0,149H	0,204H	0,251H	6	0,101H	0,175H	0,410H
	6	0,023D	0,112H	0,136H	7	0,092H	0,215H	0,265H	7	0,119H	0,253H	0,329H
	7	0,005D	0,222H	0,560H	9	0,041D	0,363H	0,195H	9	0,130H	0,150H	0,288H
27	1	0,038D	0,203H	0,316H	1	0,218H	0,411H	0,274H	2	0,140H	0,280H	0,370H
	2	0,045D	0,119H	0,281H	2	0,189H	0,397H	0,343H	4	0,076H	0,287H	0,601H
	8	0,012D	0,256H	0,578H	3	0,223H	0,049H	0,409H	5	0,087H	0,289H	0,375H
					6	0,184H	0,196H	0,234H	6	0,022D	0,277H	0,369H
					7	0,150H	0,068H	0,409H	9	0,226H	0,269H	0,418H
41	2	0,013D		0,306H	1	0,002D	0,779H	0,972H	2	0,056D	0,309H	0,118H
	3	0,014D		0,185H	4	0,077H	0,391H	0,589H	3	0,054D	0,274H	0,043D
	5	0,031D	0,438H	0,408H	5	0,119H	0,186H	0,491H	4	0,039D	0,238H	0,238H
	6	0,038D	0,180H	0,433H	7	0,052D	0,300H	0,290H	6	0,129H		
	9	0,035D	0,192H	0,210H	9	0,051D	0,346H	0,329H	7		0,259H	0,199H
47	1	0,006D	0,008D	0,003D	3	0,020D			1	0,008D	0,034D	0,025D
	3	0,028D	0,218H	0,301H	5	0,012D	0,018D	0,026D	2	0,006D	0,026D	0,032D
	4	0,046D	0,015D	0,021D	6	0,000D	0,012D	0,015D	3	0,009D	0,022D	0,044D
	7	0,036D	0,163H	0,452H	8	0,017D	0,006D	0,020D	4	0,017D	0,021D	0,014D
	8	0,025D	0,023D	0,006D	9	0,003D	0,017D	0,014D	5	0,029D	0,003D	0,006D
51	2	0,063H	0,278H	0,285H	1	0,038D	0,078H	0,549H	1	0,003D	0,187H	0,275H
	3	0,037D	0,200H	0,435H	4	0,003D	0,400H	0,402H	3	0,026D	0,325H	0,275H
	4	0,055D	0,164H	0,521H	5	0,003D	0,282H	0,837H	4	0,014D	0,404H	0,203H
	6	0,094H	0,208H	0,258H	6	0,003D	0,228H	0,223H	7	0,091H	0,343H	0,249H
	7	0,107	0,348H	0,374H	9	0,032D	0,143H	0,117H	8	0,093H	0,971H	0,346H

*D: Dayanıklı, H: Hassas

Çizelge 4.5. Seçilen biber hatlarında 3., 6.,ve 7. haftalarda PVY patotipleri için yapılan ELISA testinden alınan O.D. (405 nm) değerleri (devam)

Hatlar	PVY (0)				PVY (0,1)				PVY (0,1,2)			
	Bitki No	3. Hafta	6. Hafta	7. Hafta	Bitki No	3. Hafta	6. Hafta	7. Hafta	Bitki No	3. Hafta	6. Hafta	7. Hafta
62	1	0,006D	0,000D	0,018D	3	0,011D	0,011D	0,014D	5	0,009D	0,020D	-0,003D
	3	0,017D	0,020D	0,015D	4	0,008D	0,014D	0,000D	6	-0,017D	0,021D	0,017D
	4	0,037D	0,018D	0,018D	5	0,017D	0,006D	0,023D	7	-0,029D	0,023D	0,017D
	7	0,016D	0,020D	0,009D	7	0,020D	0,014D	0,025D	8	-0,017D	0,008D	-0,017D
	9	0,023D	0,000D	0,000D	8	0,020D	0,012D	0,023D	9	-0,023D	-0,002D	-0,017D
63	1	0,000D	0,020D	0,009D	2	0,003D	0,009D	0,003D	5	-0,014D	0,022D	0,008D
	2	0,012D	0,022D	0,032D	4	0,014D	0,020D	0,008D	6	0,006D	0,023D	0,009D
	5	0,003D	0,020D	0,009D	5	0,026D	0,043D	0,026D	7	0,006D	0,005D	0,015D
	6	0,023D	0,003D	0,000D	6	0,020D	0,003D	0,017D	8	0,012D	0,002D	0,030D
	9	0,016D	0,011D	0,018D	7	0,003D	0,009D	0,003D	9	0,003D	0,003D	0,009D
64	1	0,020D	0,187H	0,164H	1	0,000D	0,393H	0,271H	1	0,042D	0,238H	0,637H
	4	0,003D	0,353H	0,369H	3	0,000D	0,349H	0,467H	3	0,023D	0,274H	
	6	0,025D	0,197H	0,381H	5	0,002D	0,077H	0,379H	4	0,025D	0,210H	0,383H
	7	0,023D	0,218H	0,172H	6	0,040D	0,576H	0,394H	7	0,126H	0,345H	0,354H
	9	0,014D	0,370H	0,423H	9	0,039D	0,203H	0,210H	8	0,104H	0,189H	0,432H
(-)	0,019	0,014	0,011		0,018	0,016	0,012		0,020	0,022	0,015	
(+)	0,410	0,218	0,351		0,368	0,280	0,414		0,430	0,295	0,423	

*D: Dayanıklı, H: Hassas

ELISA testlerinden alınan O.D. değerlerine göre, 47 numaralı hattın bazı bitkilerinde, PVY (0) patotipine karşı pozitif değer vermiştir. Her hatta 15 bitki üzerinde yapılan ELISA testlerinde, hattın bazı bireylerinde virüse karşı farklı reaksiyonların gözlenmesi, hat içerisinde açılımın kısmen devam ettiğini göstermektedir. Denemelerde 47 numaralı hat içerisinde iki bireyde PVY (0) patotipinin inokulasyonunda yüksek virüs akümülyasyonu belirlenmiş, üç bitkide ise düşük değerler alınmıştır. PVY (0,1) ve (0,1,2) patotiplerine karşı ise bütün bitkilerde çok düşük değerler elde edilmiştir.

ELISA testlerinde, 62 ve 63 numaralı hatların bütün bitkilerinde düşük değerlerde virüs akümülyasyonu gözlenmiştir. Her aday iki hattın virüsün bütün patotiplerine karşı dayanıklı olduğunu ve hatlarda patotiplere dayanıklılıkta homozigot durumda olduğunu söylemek mümkün olmaktadır. Diğer hatların (4, 8, 11, 27, 41, 51, 64) bitkilerinde PVY patotiplerinin tamamı için ELISA testlerinde yüksek değerler alınmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Türkiye’de kırmızıbiber genotiplerinde, PVY’nün (0), (0,1) ve (0,1,2) patotiplerinin reaksiyonları biyolojik ve serolojik olarak ilk incelenmiştir. Denemelere dahil edilen 43 hattın üç tanesinde (47, 62, 63) bitkilerde, PVY patotiplerinin çoğalması ve yayılmasının düşük seviyelerde olduğu belirlenmiştir. Yapılan ELISA testlerinde, bu hatların bitkilerinden alınan örneklerde O.D. değerlerinin, pozitif kontrol olarak kullanılan bitkilerden alınan değerlerden az ve/veya negatif kontrollerden alınan değerlere yakın değerler olduğu gözlenmiştir.

İndikatör bitki olarak kullanılan W4, (Yolo Wonder x CM344) *Pvr4* lokusuna sahip ve PVY’nün patotiplerine dayanıklı genotiptir. Çelik ve ark., (2013) CM344 ile Serademre 8 çeşidinin melezlenmesiyle elde ettikleri F1 ve GMF1 bitkileri *Pvr4* genine yakın olan kodominant CAPS moleküler işaretleyicilerle testlemişlerdir. Bu çalışmada PVY’nün patotiplerine dayanıklı olduğu tespit edilen 47, 62, 63 nolu hatların geliştirilmesinde, CM344’ün gen kaynağı olarak kullanılması ve PVY’nün patotiplerine dayanıklı olması, bu hatların, *Pvr4* lokusuna sahip olabileceğini düşündürmektedir.

PVY (0) patotipi hassas hatlarda, mekanik inokulasyondan yedi gün sonra ilk belirtilerini meydana getirmiştir. Başlangıç belirtileri yapraklarda mozaikler şeklinde, ilerleyen dönemlerde kloroz ve damar nekrozuna dönüşmüştür (Bkz. Şekil 4.6).

PVY (0,1) patotipi, hassasiyet bulunan hatlarda yaprak şekil bozukluklarına neden olmuştur (Bkz. Şekil 4.7). Mekanik inokulasyondan ortalama 7 gün sonra yaprak yüzey deformasyonları belirmiş, daha sonra, yapraklarda içe kıvrılma, sararma, bitki gövdesinde şekil bozukluğu, meyvelerde boyuna renk açılması belirtilerini oluşturmuştur. Çelik ve ark., (2012) PVY (0) patotipinin Serademre 8 ve Bağcı Çarliston çeşitlerinin meyvelerinde boyuna çizgiler şeklinde belirtilerini oluşturduğunu bildirmiştir. PVY (0,1,2) patotipi, diğer patotipler gibi ilk belirtilerini inokulasyondan ortalama 7 gün sonra göstermiştir. Yaprak yüzeyinde deformasyon şeklinde başlayan belirtiler, daha sonra nekrozlara dönüşmüştür (Bkz. Şekil 4.8). Alt yapraklarda dökülmeler meydana gelmiştir. Dayanıklı olduğu tespit edilen üç hatta PVY’nün patotipleri belirtilerini oluşturmamıştır.

PVY’ne dayanıklılığı tespit edilen hatların, gen kaynağının CM344 olması nedeniyle, virüse dayanıklı baharatlık kırmızıbiber hatları geliştirme çalışmalarında, bu gen kaynağının gelecekte virüse dayanıklı hatlar geliştirilmesinde kullanılmasının uygun

olacağını söylemek mümkündür. Bunun yanısıra PBC178 melezlerinden dayanıklı hatlar tespit edilmemiştir.

Yürütülen ıslah programında 47, 62, 63 nolu hatlarında içinde bulunduğu 36 adet hattın melez kombinasyonu oluşturulmuş ve *P. capsici*'ye karşı testlenerek F3 kademesine getirilmiş olan, 45 adet sıranın test ve kendileme çalışması devam etmektedir. Islah programında, gen kaynağı olarak kullanılan genotiplerden biri olan CM 344, *P. capsici* ile PVY'ne ve kök-ur nematoduna (*Meloidogyne incognita*) dayanıklıdır. Bu etmenlere karşı, söz konusu 45 adet genotipin reaksiyonları araştırılmalı ve üç etmene de dayanabilen hat veya hatlar geliştirme doğrultusunda çalışmalar devam etmelidir. Patojenlere karşı dayanıklı çeşitlerin yetiştirilmesi, mücadelede etkin, ekonomik ve çevreye duyarlı en iyi yöntemdir.

KAYNAKLAR

- Arli-Sokmen, M., Mennan, H., Sevik, M.A., Ecevit, O., 2005. Occurrence of Viruses in Field-grown Pepper Crops and Some of Their Reservoir Weed Hosts in Samsun, Turkey. *Phytoparasitica* 33 (4): s.347-358.
- Ayme, V., Souche, S., Caranta, C., Jacquemond, M., Chadoeuf, J., Palloix, A., Moury, B., 2006. Different mutations in the genome-linked protein VPg of *potato virus Y* confer virulence on the *pvr2³* resistance in pepper. *Mol. Plant Microbe Interact* 19 (5): s.557-563.
- Ayme, V., Petit-Pierre, J., Souche, S., Palloix, A., Moury, B., 2007. Molecular dissection of the Potato virus Y VPg virulence factor reveals complex adaptations to the *pvr2* resistance allelic series in pepper. *Journal of General Virology* 88, s.1594-1601.
- Biswas, M.K., Mohasin, M., 2000. Relationship between vector pressure (*Myzus persicae* and *Aphis gossypii*) and spread of PVY and PLRV induced diseases in the plains of West Bengal. *Proceedings of the Global Conference on Potato*, New Delhi, India. Volume: 1, s.483 – 486.
- Bostan, H., Dursun, A., 2002. Kemaliye ve Yusufeli İlçelerindeki Biber (*Capsicum annuum* L.) Üretim Alanlarındaki Bazı Virüs Hastalıklarının Belirlenmesi Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg. Cilt: 33, No: 4, 391s.
- Buzkan, N., Demir, M., Öztekin, V., Mart, C., Çağlar, B.K., Yılmaz, M. A., 2006. Evaluation of the status of Capsicum viruses in the main growing regions of Turkey. *EPPO Bulletin* 36: s.15-19.
- Boonham, N., Barker, I., 1988. Strain Specific Recombinant Antibodies to *Potato Virus Y* potyvirus, *Journal of Virological Methods*, 74: s.193–199.
- Caranta, C., Lefebvre, V., Palloix, A., 1997. Polygenic resistance of Pepper to potyviruses consists of a combination of isolate-specific and broad-spectrum quantitative trait loci, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 10: s. 872-878.
- Çelik, N., Özalp, R., Göçmen, M., 2012. Antalya İlinde Örtü Altı Biber Yetiştiriciliğinde Patates Y Virüsü (PVY) Patotiplerinin Belirlenmesi ve Bazı Biber Çeşitlerinin PVY'ye Karşı Reaksiyonları Bitki Koruma Bülteni, Cilt: 52, No:3, 235s.
- Çelik, İ., Özalp, R., Çelik, N., Polat, İ., Sülü, G., Ünlü, A., 2013. Patates Y Virüsü (Potato Virus Y, PVY)'ne Dayanıklı Sivri Biber Hatlarının Geliştirilmesi *Derim*, Cilt: 30, No: 2 s. 42-53.
- Demir, M., 2005. Kahramanmaraş'ta Yetiştirilen Kırmızı Biberlerde Yaprakbiti ile Taşınan Virüslerin Saptanması, Yüksek Lisans Tezi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Kahramanmaraş. 28s.
- Edwardson, J.R., Christie, R.G., 1997. *Viruses Infecting Peppers and Other Solanaceous Crops*. University of Florida, Agricultural Experiment Station Institute of Food and Agricultural Sciences, Volume 1, 336s.

- Ekbiç, E., Abak, K., Yılmaz, M.A., 1997. New PVY Pathotype on Pepper Along Mediterranean Coastal Area of Turkey. Proc.10th Cong, Medit. Phytopath. Union, Montpellier, 1-5 June 1997. s.187-189.
- FAO, 2012. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (erişim tarihi: 10.05.2014)
- Flor, H.H., 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Ann.Rew. Phytopathology*. 9: s.275-290.
- Gugerli, P., Gehriger, W., 1980. Enzyme-linked immunoserbent Assay (ELISA) fort he detection of potato leafroll virus and potato virus Y inpotato tubers after artificial break of dormancy. *Potato Research*. 23: 3, s.353 – 359.
- Gugerli, P., Fries, P., 1983. Characterization of monoclonal antibodies topotato virus Y and their use for virus detection. *J. Gen. Virol.* 64, s.2471–2477.
- Gümüş, M., Erkan, S., Yorgancı, Ü., Duman, İ. 2001. Bazıs ebzelerin tohumlarında bulunan viral etmenlerin saptanması üzerine araştırmalar. Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, 3-8 Eylül, 2001 Tekirdağ. s.190-197.
- Hamalamen, J. H., Watanabe, K. N., Valkonen, J. P. T., Arihara, A., Plaisted, R.L., Pehu, E., Miller, L., Slack, S. A., 1997. Mapping and Marker-Assisted Selection for a Gene for Extreme Resistance to Potato Virus Y, *Theoretical and Applied Genetics*, 94: s192–197.
- Hampton, R. O., Provvidenti, R., 1992. Specific infectivity and host resistance have redicated potyviral and pathotype nomenclature but relate less to taxonomy. *Arch. Virol. Suppl.* 5: s.183-187.
- Jacquot, E., Tribodet, M., Croizat, F., Balme-Smıbaldı, V., Kerlan, C., 2005. A Single Polymorphism-based Technique for Specific Characterization of YO and YN Isolates of *Potato Virus Y* (PVY), *Journal of Virological Methods*, 125: 83–93.
- Janzac, B., Fabre, M.-F., Palloix, A., Moury, B., 2009. Phenotype and spectrum of action of the Pvr4 resistance in pepper against potyviruses, and selection for virulent variants. *Plantpathology*, 58, s.443-449.
- Kang, B. C., Yeam, I., Frantz, J. D., Murphy, J. F., Jahn, M. M., 2005. The *pvr1* locus in *Capsicum* encodes a translationin itiation factor eIF4E that interacts with Tobacco etch virus VPg. *Plant J.* 42, s.392–405.
- Kaliciak, A., Syller, J., 2009. New hosts of *Potato virus Y* (PVY) among common wild plant in Europe. *Eur.J. Plant Pathol.* 124: s.707–713.
- Kostiw, M., 1984. Effects of temperature on PVY and PVM transmission efficiency by *Myzus persicae* Sulz and *Aphis nasturtii* Kalt. *Potato Research*: 27. s.106 – 107.
- Legnani, R., Gebre-Selassie, K., Nono-Womdim, R., Gognalons, P., Moretti, A., Laterrot, H. and Marchoux, G., 1995. Evaluation and Inheritance of the *Lycopersicon hirsutum* Resistance Against Potato Virus Y. *Euphytica*, 86: s.219–226.

- Lindhout, P., 2002. The perspectives of polygenic resistance in breeding for durable disease resistance. *Euphytica*, 124, s.217-226.
- Lorenzen, J. H., Piche, L. M., Gudmestad, N.C., Meacham, T., Shiel, P., 2006. A multiplex PCR assay to characterize Potato virus Y isolates. *Plant Dis.* 90, s.935–940.
- Maule, A.J., Caranta, C., Boulton, M. I., 2007. Sources of natural resistance to Plant viruses: status and prospects. *Molecular Plant Pathology*, 8 (2): s.223-231.
- Mehle, N., Kovac, M., Petrović, N., Novak, M. P., Baebler, S., Stres, H. K., Gruden, K., Ravnkar, M., 2004. Spread of Potato Virus Y^{NTN} in Potato Cultivars (*Solanum tuberosum* L.) with Different Levels of Sensitivity, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 64: s.293–300.
- Moury, B., Morel, C., Johansen, E., Guilbaud, L., Souche, S., Ayme, V., Caranta, C., Palloix, A., Jacquemond, M., 2004. Mutations in potato virus Y genome-linked protein determine virulence towards recessive resistance in *Capsicum annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. *Mol. Plant Microbe Interact*: 17. s. 322-329.
- Palloix, A., Abak, K., Gognalons P., Daubeze A.M., Guldur M., Memouchi G., Gebre-Selassie K., 1994.a. Virus diseases infecting Pepper crops in Turkey. In: Proceedings of 9th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Kuşadası, Aydın. s.469-472.
- Palloix, A., Abak, K., Daubeze, A. M., Güldür, M., Gebre Selassie, K., 1994.b. Survey of Pepper diseases affecting the main production region of Turkey with special interest in viruses and potyvirus pathotypes. *Capsicum Eggplant Newsl*: 13, s.78-81.
- Pickersgill, B., 1997. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica*: 96, s. 129-133.
- Robaglia, C., Caranta, C., 2006. Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends Plant Sci*: 11, s.40-45.
- Singh, M., Sing, R. P., 1997. Potato virus Y deduction: sensitivity of RT-PCR depends on the size of fragment amplified. *Can J., Plant Pathology*, 19, s.149-155.
- Spetz, C., Taboada, A. M., Darwich J., Ramsell, L., Salazar, L. F., Valkonen, T., 2003. Molecular Resolution of a Complex of Potyviruses Infecting Solanaceous Crops at the Centre of Origin in Peru, *Journal of General Virology*, 84: s.2565–2578.
- TÜİK, 2013. [www.tuik.gov.tr/PreIstatistik Tablo.do?istab_id=72](http://www.tuik.gov.tr/PreIstatistikTablo.do?istab_id=72) (erişim tarihi: 11.07.2014)
- Yoon, J. Y., Green, S. K., Tschanz, A. T., Tsou, S. C. A. and Chang, L. C. 1989. Pepper Improvement in the Tropics: Problems and the Avrdc Approach. In: Proc Int Symp Integrated Management Practices Tomato and Pepper Production in the Tropics. 21-26/03/1988; Avrdc. Shanhuah. Tainan, Taiwan, s. 86-98.
- Yilmaz, M.A., Davis, R.F., 1985. Identification of Viruses Infecting Vegetable Crops along the mediterranean sea Coast in Turkey. *J. Turkish Phytopath.* Vol.14, No:1, s.1-8

EKLER

ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

Ek A.1. Kaplama Tampon Çözeltisi (Coating Buffer) pH 9.6 1000ml

Kimyasal	Miktar
Na ₂ CO ₃	1.59 gr
NaHCO ₃	2.93 gr
NaN ₃	0.2 gr

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH'sı 9.6'a ayarlanmış ve 4 °C' de saklanmıştır.

Ek A.2. Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate Buffered Saline, PBS), pH 7.4, 1000ml

Kimyasal	Miktar
NaCl	8.0 gr
KH ₂ PO ₄	0.24 gr
Na ₂ HPO ₄	1.44 gr
KCl	0.2 gr

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH'sı 7.4'e ayarlanmış ve 4°C' de saklanmıştır.

Ek A.3. Konjugat Tampon Çözeltisi (Enzyme Conjugate Buffer) pH 7.4 1000ml

Kimyasal	Miktar
PBS	1 lt
PVP	20 gr
Ovalbumin	% 2
Tween 20	0.5 ml

1 litre PBS içerisine 20 gr PVP, 2 gr ovalbümin eklendikten sonra pH ayarlandı ve 0.5 ml tween 20 ilave edilerek hazırlanmıştır.

Ek A.4. Yıkama Tampon Çözeltisi (Washing Buffer) pH 7.4 1000ml

Kimyasal	Miktar
PBS	1 lt
Tween 20	0.5 ml

1 litre PBS içerisine 0.5 ml tween 20 eklenerek hazırlanmıştır.

Ek A.5. Substrate Buffer pH 9.8 1000ml (Substrat Tampon Çözeltisi)

Kimyasal	Miktar
Diethanolamine	97 ml
NaN ₃	0.2 gr

800 ml saf su içerisine, 97 ml diethanolamine ve 0.2 gr NaN₃ ilave edildikten sonra pH 9.8'e ayarlanıp, 1 litreye tamamlanmış ve 4 °C' de saklanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, soyadı : Kerim KARATAŞ
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri :1970 Andırın
Medeni hali : Evli
Telefon : 03442376020
Faks : 03442377196
e-posta : kerim_krts@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	KSÜ /Bitki Koruma Bölümü	2014
Lisans	C.Ü./ Tokat Ziraat Fakültesi	1994
	Bitki Koruma Bölümü	1994
Lise	Andırın Lisesi	1989

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
1998-2002	Andırın	Sınıf Öğretmeni
2002 -2014	DAGTİM	Ziraat Müh.

Yabancı Dil

İngilizce