

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

YABANI ŞEKER PANCARI TÜRLERİNDE RHİZOMANİA'YA DAYANIKLI  
GENOTİPLERİN BELİRLENMESİ

Filiz Mutaf

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Ali Ergül

MART

2015

## **ETİK BEYAN**

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Filiz MUTAF

İmzası

Prof. Dr. Ali ERGÜL danışmanlığında, Filiz Mutaf tarafından hazırlanan bu çalışma 13/3/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN

İmza:

Üye : Prof. Dr. Ali ERGÜL

İmza:

Üye : Doç. Dr. Gölge SARIKAMIŞ

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Yabani Şeker Pancarı Türlerinde Rhizomania'ya Dayanıklı Genotiplerin Belirlenmesi

Filiz MUTAF

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Ali Ergül

Rhizomania hastalığı şeker veriminde %80'lere kadar düşüşe neden olmakta ve pancar ekim alanlarımızın tamamına yakınının Rhizomania ile bulaşık olduğu kabul edilmektedir. Hastalığa yol açan Şeker Pancarı Nekrotik Sarı Damar Virüsü = BNYVV'ye karşı kimyasal mücadele yöntemleri etkisiz olup, ülkemizin bütün pancar ekim alanlarında dayanıklı çeşitlerin kullanılması kaçınılmazdır. Şeker pancarının yabani türleri, bazı morfolojik karakterler ile stres faktörlerine, hastalık ve zararlılara dayanıklılık gibi genetik özellikleri açısından önemli bir gen kaynağıdır. Yabani pancar popülasyonlarında, Real Time PCR ile virüs genlerinin ifade analizleri, Rhizomania'ya dayanıklı genotiplerin ortaya çıkarılması açısından oldukça önemlidir.

Bu tez çalışmasında; BNYVV virüsüne ait gen bölgelerinin ifade analizleri, *Beta* ve *Corollinae* seksiyonuna ait yabani pancar genotiplerinde, virüs genlerinin bitki genomundaki bulunma oranını çok hassas olarak tanımlayabilen ve virüs gen ifade analizlerine olanak sağlayan TaqMan Real Time PCR ile gerçekleştirilmiştir. *B. maritima*, *B. adanensis*, *B. trigyna*, *B. lomatogona*, *B. corolliflora*, *B. intermedia* ve *B. macrorhiza*'ya ait genotipler arasında BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri açısından düşük ifade farklılıkları ile BNYVV'ye karşı yüksek tolerans gösterdikleri belirlenmiştir. Seksiyonlar açısından farklılıkların düşük olmasının yanı sıra; genotipler açısından tolerans farklılıklarının olabileceği belirlenmiştir.

2015, 85 sayfa

**Anahtar kelimeler:** *Beta*, BNYVV, *Corollinae*, Rhizomania, TaqMan Real Time PCR.

## ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Identification of Rhizomania Resistant Genotypes in Wild Beet Species

Filiz Mutaf

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Dr. Ali Ergül

Rhizomania is a disease of sugar beet caused by Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV) and it can reduce sugar yield up to 80% in sugar beet. In Turkey, it has been estimated that almost all sugar beet cultivation areas have been infected with Rhizomania. Due to the fact that there is no chemical treatment existing against disease-causing BNYVV, cultivation of disease-resistant sugar beet types is inevitable in Turkey's infested cultivation areas. Wild types of sugar beet are very valuable gene sources and have some morphological characteristics which make them resistant to diseases, pests, and stress factors. In the wild sugar beet population, investigation of the virus gene expression analysis via TaqMan Real Time PCR method in order to screen disease-resistant plant gene regions will be important for obtaining disease-resistant genotypes.

In this thesis, TaqMan Real Time PCR analysis was performed for *Beta* and *Corollinae* section of the wild sugar beet. This method is able to detect abundance of virus genes in plant genomes very sensitively and enables us to perform gene expression analysis. It was observed that there were small expression differences in RNA1, RNA2, RNA3 and RNA4 regions of the BNYVV amongst genotypes of *B. maritima*, *B. adanensis*, *B. trigyna*, *B. lomatogona*, *B. corolliflora*, *B. intermedia* and *B. macrorhiza*. It was also shown that these genotypes are tolerated to BNYVV. In addition to low differences between *Beta* and *Corollinae* sections, it was observed that there might be differences between tolerances of genotypes.

2015, 85 pages

**Key Words:** *Beta*, BNYVV, *Corollinae*, Rhizomania, TaqMan Real Time PCR

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitim sürecim boyunca benden hiçbir zaman bilgisini ve desteğini esirgemeyen, bilimsel olarak yetitebilmemin yanısıra fikirleriyle bana her zaman yol gösteren ve kişisel olarak gelişmeme de her zaman katkıda bulunan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Ali Ergül'e en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında her türlü olanağından yararlandığım Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü ve Bitki Biyoteknolojisi ailesi'ne,

Tüm yüksek lisans eğitim sürecimde benden bilgisini, desteğini ve dostluğunu esirgemeyen Dr. Canan Yüksel Özmen'e,

Real time (eş zamanlı) qRT-PCR istatistik analizlerindeki yardımları için Uzm. Bio. Umut Kibar'a,

Üniversite eğitim hayatım boyunca benden desteğini esirgemeyen dostum Uzm. Bio.Ece Kartal'a,

Hayatımın en özel insanları iyiki benim ailem dediğim, annem ve babam Sevdime MUTAF ve Yüksel MUTAF'a, en büyük destekçilerimden biricik kardeşim Hamdi Hakan MUTAF'a eğitim süresince maddi ve manevi her türlü destekleri ve bu yolda her zaman yanımda oldukları için teşekkür ederim.

Tez çalışması TÜBİTAK 113O096 numaralı 'Şeker Pancarında Rhizomania'ya Dayanıklı Ebeveyn Hatların Geliştirilmesi ve Yabani Pancar Populasyonlarında Dayanıklı Genotiplerin Belirlenmesi' projesi kapsamında yürülmüştür.

Filiz MUTAF

Ankara, Mart 2015

# İÇİNDEKİLER

<b>ETİK BEYAN</b> .....	<b>I</b>
<b>ÖZET III</b>	
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IV</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>V</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>VI</b>
<b>SEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>XII</b>
<b>SİMGELER DİZİNİ</b> .....	<b>XIII</b>
<b>1.GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. ŞEKER PANCARI SİSTEMATİĞİ VE YABANI PANCARLAR</b> .....	<b>3</b>
2.1.1. <i>Beta</i> L. Cinsinin Seksiyonları ve Bitki Türleri .....	4
2.1.1.1. <i>Beta</i> seksiyonunun pancar türleri: .....	4
2.1.1.2. <i>Corollinae</i> seksiyonunun yabancı şeker pancarı türleri: .....	4
2.1.1.3. <i>Nanae</i> seksiyonunun yabancı şeker pancarı türü: .....	4
2.1.1.4. <i>Procumbentes</i> seksiyonunun yabancı pancar türleri: .....	4
<b>2.2. ŞEKER PANCARI NEKROTİK SARİ DAMAR VİRÜSÜ (BNYVV)</b> .....	<b>5</b>
2.2.1. Yapısı ve Genom Organizasyonu .....	5
2.2.2. Irkları .....	6
2.2.3. Bulaşıklık Belirtileri .....	7
2.2.4. Coğrafi Dağılımı .....	8
2.2.5. Virüsün Vektör <i>Polymyxa betae</i> Keskin İle Taşınması, Enfeksiyonu.....	9
<b>2.3. BNYVV'YE VE YABANI PANCAR DAYANIKLILIĞINA YÖNELİK BİYOTEKNOLOJİK YAKLAŞIMLAR</b> .....	<b>10</b>
2.3.1. Nematoda dayanıklılık ıslahı .....	10
2.3.2. Kuraklık tolerans ıslahı .....	11
2.3.3. Rhizomania dayanıklılığında Sitoplazmik Erkek Kısır (CMS) hatları ve paraleli O-tip bitkilerin MAS markırlar ile seleksiyonu.....	12
2.3.4. Rhizomania Dayanıklılık Genleri MAS Markır Seleksiyonları .....	13
2.3.5. BNYVV Tiplendirme ve Tanı Çalışmaları.....	14
2.3.6. Yabancı Pancar Gen Kaynaklarında Dayanıklılık Düzeyleri/Real Time PCR ...	16
<b>2.4. BİTKİLERDE GEN İFADESİNİN BELİRLENMESİNE YÖNELİK YAKLAŞIMLAR</b> .....	<b>17</b>
2.4.1. Real Time PCR (RT-PCR) (Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) .....	17
2.4.2. Real Time PCR Çalışmalarında Kontrol (Housekeeping) Genleri.....	19
2.4.3. Real Time PCR Özgül Belirleme Sistemleri / TagMan® Prob Yöntemi.....	20
<b>3. GEREKÇE VE AMAC</b> .....	<b>21</b>
<b>4. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>22</b>
<b>4.1. BİTKİSEL MATERYAL</b> .....	<b>22</b>
<b>4.2. YABANI PANCAR TOHULARININ ÇİMLENDİRİLMESİ</b> .....	<b>23</b>
<b>4.3. YABANI PANCARLARA VİRÜS BULAŞTIRMA, ELISA TESTİ</b> .....	<b>25</b>
4.3.1. Virüs Bulaştırma.....	25

4.3.2. ELİSA Testi.....	26
<b>4.4. YABANI PANCARLARDA TAQMAN-REAL TIME-PCR İLE İFADE ANALİZLERİ.....</b>	<b>27</b>
4.4.1. RNA İzolasyonu .....	27
4.4.2. Total RNA'dan cDNA sentezi.....	28
4.4.3. İfade Analizlerinde Kullanılan Taqman Primer/Prob Dizileri .....	29
4.4.4. Standart Eğrilerin Oluşturulması ve Optimizasyon Koşulları.....	30
4.4.5. Örneklerin Alete Yüklenmesi.....	32
<b>5.ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>34</b>
5.1. ELİSA TESTİ .....	34
5.2. RNA İZOLASYONU, MİKTAR VE KALİTE TAYİNİ.....	35
5.3. CDNA SENTEZİ .....	36
5.4. PRİMER/PROB ÇİFTLERİNE AİT STANDART EĞRİLERİN OLUŞTURULMASI .....	37
5.5. İFADE ANALİZLERİ.....	37
5.5.1. Gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri.....	39
5.5.2. Real Time PCR Verilerinin İfade Analizleri .....	41
<b><u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</u></b>	<b><u>60</u></b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>63</b>
<b>EK1: 35 yabancı pancar genotipinde 3 teknik tekrara ait ct (cycle threshold) değerleri.....</b>	<b>66</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>70</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Şeker pancarı nekrotik sarı damar virüsü'nün genom organizasyonu.....	5
Şekil 2.2. Rhizomania hastalığının yapraklarda neden olduğu sararma, köklerde sakallanma ve kök kesitindeki nekrotik halkalar.....	7
Şekil 2.3. Türkiye' de Rhizomania ile bulaşık alanlar.....	9
Şekil 2.4. <i>Polymyxa betae</i> Keskin'nın yaşam döngüsü.....	10
Sekil 3.1 Real Time PCR Döngü Aşamaları.....	18
Şekil 3.2. TaqMan Prob çalışma prensibi.....	20
Şekil 4.1. Çimlendirme ortamındaki tohumların görünüşü.....	23
Şekil 4.2. Sürgün ortamına aktarılan bitkilerin görünüşü.....	24
Şekil 4.3. Köklendirme ortamına aktarılan bitkilerin görünüşü.....	25
Şekil 4.4. Toprağa adaptasyonları sağlanan yabancı bitkilerin görünüşü.....	25
Şekil 4.5. Ankara, Ayaş Bölgesi, Balçıçek Kantarı toprağına ait 1-RNA1 (806 bç), 2-RNA2 (889 bç), 3- RNA3 (954 bç) ve 4- RNA4 (1033 bç), M: Markır bölgelerinin RT-PCR agaroz jel (%2) görüntüsü.....	26
Şekil 5.1. İzole Edilen RNA'lara Ait Bazı RNA'ların Agaroz Jel (%1.2 ) Görüntüsü.....	35
Şekil 5.2. Real Time PCR cihazından alınan RNA1 Primerine Ait Standart Eğri Grafiğı Efficiency ve Slope Değerleri.....	38
Şekil 5.3. Real Time PCR cihazından alınan RNA2 Primerine Ait Standart Eğri Grafiğı Efficiency ve Slope Değerleri.....	38
Şekil 5.4. Real Time PCR cihazından alınan RNA3 Primerine Ait Standart Eğri Grafiğı Efficiency ve Slope Değerleri.....	38
Şekil 5.5. Real Time PCR cihazından alınan RNA4 Primerine Ait Standart Eğri Grafiğı Efficiency ve Slope Değerleri.....	39
Şekil 5.6. Real Time PCR cihazından alınan Glutamin sentetaz Genine Ait Standart Eğri Grafiğı Efficiency ve Slope Değerleri.....	39
Şekil 5.7. RNA1 primerinde kontrol ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri.....	40
Şekil 5.8. RNA2 primerinde kontrol ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri.....	40
Şekil 5.9. RNA3 primerinde kontrol ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri.....	40
Şekil 5.10. RNA4 primerinde kontrol ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri.....	41
Şekil 5.11. Glutamin sentetaz geninde kontrol ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri.....	41
Şekil 5.12.a. 4 gen bankası numarasına sahip <i>Beta maritima</i> (Antalya) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	42

Şekil 5.12.b. 6 gen bankası numarasına sahip <i>Beta maritima</i> (Adana) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	42
Şekil 5.12.c. 8 gen bankası numarasına sahip <i>Beta maritima</i> (Trabzon) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	43
Şekil 5.12.d. 27 gen bankası numarasına sahip <i>Beta maritima</i> (İzmir) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	43
Şekil 5.12.e. 29 gen bankası numarasına sahip <i>Beta maritima</i> (İzmir) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	44
Şekil 5.13.a. 5 gen bankası numarasına sahip <i>Beta adanensis</i> (Adana) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	44
Şekil 5.13.b. 25 gen bankası numarasına sahip <i>Beta adanensis</i> (Adana) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	45
Şekil 5.13.c. 28 gen bankası numarasına sahip <i>Beta adanensis</i> (Adana) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	45
Şekil 5.13.d. 39 gen bankası numarasına sahip <i>Beta adanensis</i> (Çanakkale) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	46
Şekil 5.13.e. 53 gen bankası numarasına sahip <i>Beta adanensis</i> (Adana) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	46
Şekil 5.14.a. 47 gen bankası numarasına sahip <i>Beta trigyna</i> (Bolu) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	47
Şekil 5.14.b. 48 gen bankası numarasına sahip <i>Beta trigyna</i> (Kütahya) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	47
Şekil 5.14.c. 125 gen bankası numarasına sahip <i>Beta trigyna</i> (Eskişehir) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	48
Şekil 5.14.d. 227 gen bankası numarasına sahip <i>Beta trigyna</i> (Bilecik) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	48
Şekil 5.14.e. 260 gen bankası numarasına sahip <i>Beta trigyna</i> (Erzurum) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	49
Şekil 5.15.a. 12 gen bankası numarasına sahip <i>Beta lomatogona</i> (Erzurum) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	49
Şekil 5.15.b. 13 gen bankası numarasına sahip <i>Beta lomatogona</i> (Erzurum) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	50
Şekil 5.15.c. 14 gen bankası numarasına sahip <i>Beta lomatogona</i> (Erzurum)	

genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	50
Şekil 5.15.d. 222 gen bankası numarasına sahip <i>Beta lomatogona</i> (Isparta) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	51
Şekil 5.15.e. 224 gen bankası numarasına sahip <i>Beta lomatogona</i> (Isparta) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	51
Şekil 5.16.a. 1 gen bankası numarasına sahip <i>Beta corolliflora</i> (Erzurum) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	52
Şekil 5.16.b. 2 gen bankası numarasına sahip <i>Beta corolliflora</i> (Kars) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	52
Şekil 5.16.c. 3 gen bankası numarasına sahip <i>Beta corolliflora</i> (Ağrı) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	53
Şekil 5.16.d. 81 gen bankası numarasına sahip <i>Beta corolliflora</i> (Bilecik) genotiplerinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	53
Şekil 5.16.e. 89 gen bankası numarasına sahip <i>Beta corolliflora</i> (Bilecik) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	54
Şekil 5.17.a. 19 gen bankası numarasına sahip <i>Beta intermedia</i> (Eskişehir) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	54
Şekil 5.17.b. 20 gen bankası numarasına sahip <i>Beta intermedia</i> (Eskişehir) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	55
Şekil 5.17.c. 21 gen bankası numarasına sahip <i>Beta intermedia</i> (Eskişehir) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	55
Şekil 5.17.d. 22 gen bankası numarasına sahip <i>Beta intermedia</i> (Eskişehir) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	56
Şekil 5.17.e. 23 gen bankası numarasına sahip <i>Beta intermedia</i> (Eskişehir) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	56
Şekil 5.18.a. 197 gen bankası numarasına sahip <i>Beta macrorhiza</i> genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	57
Şekil 5.18.b. 239 gen bankası numarasına sahip <i>Beta macrorhiza</i> genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	57
Şekil 5.18.c. 244 gen bankası numarasına sahip <i>Beta macrorhiza</i> genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	58
Şekil 5.18.d. 245 gen bankası numarasına sahip <i>Beta macrorhiza</i> genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	58

Şekil 5.18.e. 257 gen bankası numarasına sahip <i>Beta macrorhiza</i> genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi.....	59
--	----

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Rhizomania (BNYVV)'nin ülke ve yıl bazında belirlenmesi.....	8
Çizelge 4.1. <i>Beta</i> ve <i>Corollinae</i> seksiyonuna ait bitki materyal listesi.....	22
Çizelge 4.2. Tohum çimlendirme ortamı içeriği.....	23
Çizelge 4.3. Sürgün ortamı içeriği.....	24
Çizelge 4.4. Köklendirme ortamı içeriği.....	25
Çizelge 4.5. İfade analizlerinde kullanılan Taqman prob/primer çifti dizileri.....	29
Çizelge 4.6. RNA1 bölgesine ait Taqman primer/prob optimizasyon koşulları.....	30
Çizelge 4.7. RNA2 bölgesine ait Taqman primer/prob optimizasyon koşulları.....	31
Çizelge 4.8. RNA3 bölgesine ait Taqman primer/prob optimizasyon koşulları.....	31
Çizelge 4.9. RNA4 bölgesine ait Taqman primer/prob optimizasyon koşulları.....	31
Çizelge 4.10. Glutamin sentetaz genine ait Taqman primer/prob optimizasyon koşulları.....	31
Çizelge 4.11. Real Time PCR Programı.....	32
Çizelge 5.1. Yabani pancar örneklerine ait ELİSA testi sonuçları.....	34
Çizelge 5.2. 35 Örnek ve Bir Kontrole Ait RNA'ların Spektrofometrik Ölçümleri....	35
Çizelge 5.3. 35 adet örnek ve Bir Kontrole Ait cDNA'ların Spektrofometrik Ölçümleri.....	36

## SİMGELER DİZİNİ

BAP	Benzilamino Pürin
bç	Baz çifti
BNYVV	<i>Beet necrotic yellow vein virus</i>
CMS	Sitoplazmik Erkek Kısır
CP	Kapsid proteini
Ct	Eşik döngü değeri
dk	Dakika
IBA	İndol Butirik Asid
kDa	Kilodalton
MAS	Markıra Dayalı Seleksiyon
mg	Miligram
MS	Murashige and Skoog Medium
nm	Nanometre
pmol	Pikomol
Real time PCR	Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Revolutions per minute
µl	Mikrolitre

## 1.GİRİŞ

İnsan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan şeker, dünyada en çok şeker kamışı ve şeker pancarından üretilmektedir. Türkiye; AB, ABD ve Rusya'dan sonra dünyanın 4üncü; AB ve Rusya'dan sonra ise Avrupa'nın 3üncü büyük pancar şekeri üreticisi konumundadır. Ülkemizde yetiştirilen endüstri bitkileri içerisinde şeker pancarı (*Beta vulgaris* var. *saccharifera* L.) önemli bir yere sahiptir. 2013/2014 yılı sektör raporu verilerine göre ülkemizde toplam tarım alanı içerisinde yıllık şeker pancarı ekim alanı 290.900 hektar, üretim miktarı ise 16489 bin tondur (1). Türkiye'de şeker pancarı tarımı, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri dışındaki beş bölgede yapılmaktadır.

Şeker pancarı üretim alanlarında görülen hastalıklardan virüs ve benzeri etmenlerin neden olduğu kayıplar ciddi boyutlara ulaşarak üretimi tehdit etmektedir (2). Şeker pancarı üretiminde ekonomik düzeyde ürün kaybına neden olabilen en önemli virüslerden biri BNYVV (Beet necrotic yellow vein virus=Şeker Pancarı Nekrotik Sarı Damar Virüsü) olup, köklerde aşırı kılcal kök oluşumundan dolayı hastalığa kök azmanlığı anlamına gelen Rhizomania' adı verilmiştir (3). Ülkemizde şeker pancarı tarımının yapıldığı alanlarının tamamına yakını Rhizomania hastalığı ile bulaşıktır. Hastalık tarımsal uygulamalarla (sulama suyu, toprak ve toprak işleme aletleri vb) çok kolay yayıldığından, dünyada şeker pancarı üretiminin yapıldığı tüm alanlarda da topraklar Rhizomania ile bulaşık durumdadır.

BNYVV virüsü, ilk olarak Bahattin Keskin tarafından teşhis edilen toprak mantarı *Polymyxa betae* Keskin aracılığıyla şeker pancarı köklerine bulaşmaktadır. Virüs semptomları özellikle köklerde görülmekte, bitkilerde kılcal köklerin aşırı çoğalması ile ana kök etrafında sakal görünümü oluşmakta, kök ucunun boğulması nedeniyle kökler şarap kadehi şeklini almakta ve kök kesitlerinde nekrotik halkalar görülmektedir. Hastalık, şeker veriminde %80'lere kadar düşüşe ve düşük işleme kalitesi gibi istenmeyen sonuçlara neden olmaktadır. Hastalığa yol açan BNYVV'ye karşı kimyasal mücadele yöntemleri ise etkisiz olup, ülkemizin bütün pancar ekim alanlarında dayanıklı çeşitlerin kullanılması kaçınılmazdır. Ülkemizin en ekonomik bitkilerinden birisi olan şeker pancarında; Rhizomania dahil abiotik/biotik koşullara dayanıklı milli "şeker pancarı hat ve çeşitleri" bulunmamaktadır.

Şeker pancarının yabani türleri, bazı morfolojik karakterler ile stres faktörleri, hastalık ve zararlılara dayanıklılık gibi genetik özellikleri açısından önemli bir gen kaynağıdır. Dolayısıyla ulusal pancar gen kaynaklarımızın ıslah ve genetik materyal olarak Rhizomania'ya dayanıklılıklarının değerlendirilmesi ve üstün genotiplerin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır.

Şeker pancarı ile ilgili yapılan çalışmalar daha çok nematoda, kuraklığa karşı dayanıklılık ve sitoplazmik erkek kısır hatların geliştirilmesi ile ilişkili olup ayrıca BNYVV virüsünün tiplerine ve coğrafik dağılımına yönelik değişik boyutlu konvansiyonel tanı (ELISA, RT-PCR) araştırmaları da yürütülmektedir. Yabani pancar gen kaynaklarımızın Rhizomania'ya dayanıklı genotiplerin seçimi açısından taranmadığı görülmektedir.

Bu tez çalışmasında, mevcut moleküler veriler ışığında virüs bulaştırılmış yabani popülasyonda virüs RNA parçalarına spesifik geliştirilen proplar kullanılarak Real Time PCR ile virüs genlerinin ifade analizleri ile tolerant (virüsün az bulaştığı) genotiplerin seçilmesine yönelik ön bulgular sağlanmıştır. Bu bulgular yabani pancar tolerans düzeylerinin belirlenmesi ve geleceğe yönelik araştırmalarda yabani pancar dayanıklılık gen havuzunun oluşturulması açısından öneme sahiptir.



## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. Şeker Pancarı Sistematiği ve Yabani Pancarlar

Pancarlar, botanikte Kazayağgiller (*Chenopodiaceae*) ailesinin *Beta* L. veya *Beta* Tournef. (L.) cinsi bitki tür ve formlarıdır. *Beta* L. cinsi dört büyük seksiyona ayrılır:

- *Beta* veya *Vulgares* Ulbrich / Transel
- *Corollinae* Ulbrich / Transel
- *Nanae* Ulbrich
- *Procumbentes* Ulbrich veya *Patellares* Transel

*Beta* seksiyonu, bir dizi yabani pancar türünün yanında, *Beta vulgaris* L. türünün ssp. *vulgaris* ve ssp. *cicla* alt türleri olarak bilinen kültür pancarlarının tamamını içeren en önemli seksiyondur. Diğer seksiyonlar, yalnızca yabani pancar ve bazı pazı türlerini kapsar. Ancak, bütün seksiyonlar içerdikleri tüm pancar formları ile hastalıklara (*Cercospora*, *Polymyxa*, *Rhizomania*, Curly top, Sarılık, Mozaik vb.), zararlılara (Sist Nematodu vb.), dona, kuraklığa ve tuza dayanıklılık veya tolerans gibi, pratikte kültür pancarlarına aktarılabilecek genetik özellikler açısından önemli gen kaynaklarını oluştururlar.

Kültür formları, sürekli olarak yüksek verim ve kalite hedefleyen ıslah çalışmaları sonucunda geliştirilen yeni çeşitler ile gen (özellik) kaybına veya erozyonuna uğramaktadır. Bu açıdan, yabani genotiplerin genetik önemi daha iyi anlaşılmaktadır. 39 yıl öncesine kadar, *Rhizomania* adı verilen ve bugün şeker pancarı ekim alanlarını tehdit eden virüs hastalığı görülmemektedir.

*Beta* ve *Corollinae* seksiyonlarında, bu hastalığa veya taşıyıcısı *Polymyxa betae* mantarına dayanıklı genotipler bulunmaktadır. Yakın gelecekte, gelişen gen teknolojisi ile yabani genotiplerden istenen özelliklerin kültür formlarına aktarımı gerçekleştirilebilecektir. Bu amaçla, 16 ülkede *Beta-Gen* Bankası açılmıştır. Çoğunlukla, yabani pancar formlarının gen merkezlerinde bulunan bu bankalar, ilerde ıslahçıların hizmetine sunmak üzere, bölgelerindeki formların sınıflamasını, tohumlarının toplanmasını, saklanmasını ve zaman zaman da üretimini yapmaktadır. Böylece, bugün yok olma tehlikesi ile karşı karşıya

kalan birçok form ve ekotip de koruma altına alınmaktadır (4).

### **2.1.1. *Beta* L. Cinsinin Seksiyonları ve Bitki Türleri**

#### **2.1.1.1. *Beta* Seksiyonunun Pancar Türleri:**

1. *Beta maritima* L.  $2n=2x$ , yabancı kıyı pancarı (Avrupa kıyıları, Akdeniz kıyıları ve Yakın Doğu)
2. *Beta trojana* Pamukçuoğlu,  $2n = 2x$ , yabancı Trova pancarı (Trova ve Didim Kıyıları / Anadolu)
3. *Beta adanensis* Pamukçuoğlu,  $2n = 2x$ , yabancı Adana pancarı (Güney Marmara, Ege ve Akdeniz kıyıları ile Anadolu'nun iç kısımları)
4. *Beta macrocarpa* Gussone,  $2n=2x$  ve  $4x$ , büyük tohumlu yabancı pancar (Yunanistan kıyılarından başlar, Batı Akdeniz kıyıları ve Kanarya Adaları)
5. *Beta atriplicifolia* Rouy,  $2n=2x$ , yabancı pancar (Güney İspanya)
6. *Beta patula* Aiton,  $2n=2x$ , yabancı pancar (Madeira Adaları)
7. *Beta orientalis* Roth,  $2n=2x$ , Hindistan ve Himalaya
8. *Beta vulgaris* L.,  $2n=2x$ ,  $3x$  ve  $4x$ , kültür pancarları (4)

#### **2.1.1.2. *Corollinae* Seksiyonunun Yabancı Şeker Pancarı Türleri:**

1. *Beta lomatogona* Fischer et Meyer,  $2n = 2x$ , Kızılca (Anadolu, Azerbaycan, İran Azerbaycan'ı, Ermenistan ve Batı İran)
2. *Beta macrorhiza* Steven,  $2n = 2x$ , Kızılca (Anadolu, Dağıstan, Azerbaycan, İran Azerbaycan'ı ve Ermenistan)
3. *Beta corolliflora* Buttler,  $2n = 4x$ , Kızılca (Türkiye, Gürcistan, Batı Azerbaycan, İran Azerbaycan'ı ve Ermenistan)
4. *Beta trigyna* Waldstein et Kitaibel,  $2n = 6x$ , Doğu Avrupa (4)

#### **2.1.1.3. *Nanae* Seksiyonunun Yabancı Şeker Pancarı Türü:**

1. *Beta nana* Boissier et Heldreich,  $2n = 2x$ , Yunanistan'ın yüksek dağları (Olympos, Parnass ve Taygetos) (4)

#### **2.1.1.4. *Procumbentes* Seksiyonunun Yabancı Pancar Türleri:**

1. *Beta patellaris* Moquin,  $2n = 2x$  ve  $4x$ , Kanarya Adaları, Madeira Adaları, Selvagens Adaları, Kap Verde Adaları ve Fas'ın Okyanus Kıyıları

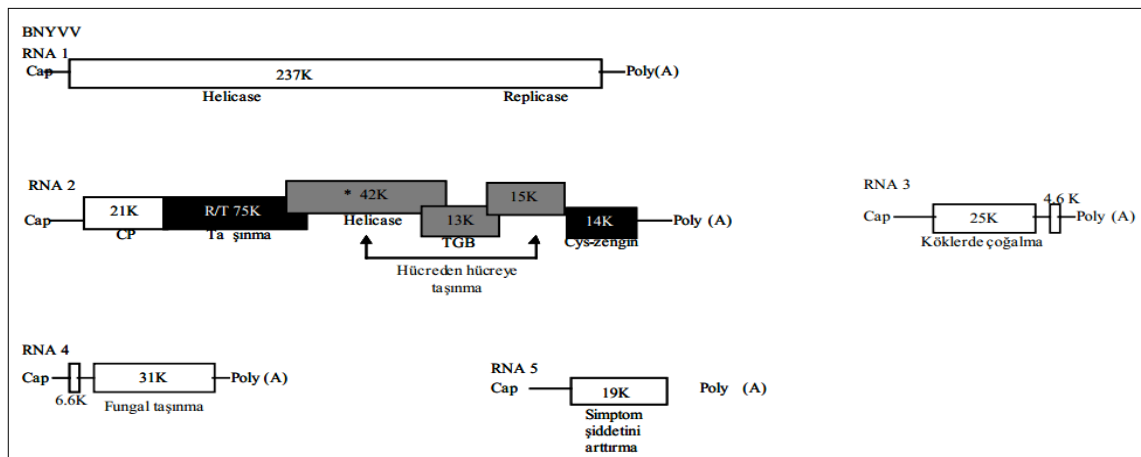
2. *Beta procumbens* Christian-Smith, 2n = 2x, Kanarya Adaları ve Kap Verde Adaları
3. *Beta webbiana* Moquin, 2n = 2x, Kanarya Adaları (4)

## 2.2. Şeker Pancarı Nekrotik Sarı Damar Virüsü (BNYVV)

### 2.2.1. Yapısı ve Genom Organizasyonu

BNYVV; 1987 yılında virüslerin adlandırılması ve taksonomisi üzerinde çalışan uluslararası komite tarafından *Furovirus* cinsi içinde yer alırken; 2000 yılında yapılan yeni düzenlemeyle *Furovirus* cinsi; *Pomovirus*, *Pecluvirus*, *Furovirus* ve *Benyvirus* olmak üzere dört farklı cinse ayrılmış ve BNYVV *Benyvirus* cinsine dahil edilmiştir (5,6). Virüs partikülleri içi boş, düz çubuk şeklinde ve 20 nm eninde olup 390, 270, 105, 90 ve 80 nm uzunluğundadır. BNYVV virüs izolatları serolojik olarak aynı özellikleri gösterirken virüs genomu pozitif polarite gösteren 4-5 tek zincir (ssRNAs) RNA yapısına sahip olup membransızdır (5). Bu RNA'lar 21kDa büyüklüğündeki aynı kapsid proteini ile (CP) çevrelenmiş olup (3), kapsid proteininin 3' ucunda ise 65-140 A kalıntıları ile poliadenilat 5' ucunda şapka bölgesi (3) bulunmaktadır.

BNYVV genomu genellikle değişen büyüklüklerde dört adet RNA içermektedir (RNA 1, RNA 2, RNA 3 ve RNA 4). RNA 1 ve RNA 2'ye viral replikasyon ve virüs taşınmasında ihtiyaç duyulurken, RNA 3 ve RNA 4 doğada virüsün yayılması ve hastalık gelişiminde gereklidir (6) (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Şeker pancarı nekrotik sarı damar virüsü'nün genom organizasyonu (7)

RNA 1 nükleotid uzunluğu 6746 bç olup RNA bağımlı-RNA polimeraza sahipken RNA 2 nükleotid uzunluğu 4612 bç olup aralarında zarf proteini (CP)'nin de bulunduğu 6 farklı proteini kodlamaktadır. Kodlanan proteinlerden P42 proteini; hücre-hücre etkileşimleri aracılığı ile virüs genomunun farklı hücelere giriş yapabilmesinde rol oynarken, P14 proteini ise RNA2' nin replikasyonunda, translasyonda yine yeni oluşan virüs genomları için zarf proteinin sentezinin arttırılmasında görev almaktadır (8). p25 proteini ise uzunluğu 1775 bç RNA3'ün 445-1102 bç arasındaki bölgeden kodlanmakta olup, özellikle Rhizomania semptomlarından sorumlu olduğu belirtilmektedir (9). p25 proteinin 67-70 arasındaki amino asit dizisinin değişkenlik (68. amino asit) gösterdiği, buna bağlı olarak BNYVV izolatlarının patojenitelerinin değiştiği bildirilmektedir (10,11). RNA4 1431 bç uzunluğunda olup virüsün vektörüyle köklere girişinde anahtar rol oynadığı ve bu girişin izolatlarda RNA3 bulunduğu daha etkin gerçekleştiği bilinmektedir (6). RNA5, 547-1327 bç arasındaki bölgeden P26 proteinini kodlarken sadece RNA1-4'ü içeren virüs ırkları ile karşılaştırmalı yapılan araştırmalarda RNA5'in virüsün farklı Rhizomania semptomlarından sorumlu olduğu gözlemlenmiştir (12). RNA3, RNA4 ve RNA5 arasındaki etkileşimlerle ise semptomların etkisi artmaktadır (6) (Şekil 2.1.).

### **2.2.2. Irkları**

BNYVV virüsü, içerdiği RNA kompozisyonuna göre A, B ve P olmak üzere temelde 3 patojenite sınıfına ayrılmaktadır (13,14). ELISA ve RT-PCR'a dayalı virus tanı çalışmalarında baz alınan tiplere ve RNA kompozisyonlarına göre ırklar sınıflandırılmıştır. Tip A, Avrupa ülkeleri, Amerika, Çin ve Japonya' da görülürken tip B daha sınırlı alanda (daha çok Almanya ve Fransa) yayılım göstermektedir. P tipi olarak adlandırılan grup ise ek bir RNA (RNA5) içermekle birlikte ilk olarak 1997 yılında Pithivier-Fransa yakınlarında, sonrasında 2000 yılında Kazakistan ve 2007 yılında İngiltere'de tespit edilmiştir. Japonya, Çin ve Almanya'da ise RNA5'i içeren diğer izolatlar tespit edilmiştir (14). Doğu Asya ülkelerinde (Japonya, Çin) görülen BNYVV tiplerinin Avrupa ülkelerinde görülen A ve B tipleri ile benzer olduğu fakat birebir aynı olmadıkları belirtilmektedir (13). Çin ve Japonya'da RNA5 içeren örneklerin A veya B tipleri ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (13). Ayrıca ayrı BNYVV varyantları incelendiğinde RNA5'in Fransa ve Kazakistan'da tanımlanan P tipi ile ilişkili ve RNA5 içeren örneklerin içermeyenlere göre daha patojenik olduğunun kanıtı olduğu belirtilmektedir (13). A, B ve P tipleri başlangıçta RFLP ve SSCP analizleri ile tanımlanmıştır. Avrupa ülkelerinde görülen A, B ve P tiplerindeki referans

dizi farklılıkları ve RNA içeriklerindeki farklılıklar “International Committee on Taxonomy of Viruses, VIII report” komitesinin 8. raporunda listelenmiştir (13). Tiplendirme çalışmalarına bakıldığında sözkonusu bildiride belirtilen ve referans olarak kullanılacak A, B, P tipleri dikkate alınarak karşılaştırmalar üzerine yoğunlaşmıştır. Ülkemizde ise yaygın olan ırk grubu A tipidir (4).

### 2.2.3. Bulaşıklık Belirtileri

Hastalık yapraklarda, damarlar boyunca sarı renk açılmalarına ve yapraklarda dik gelişime neden olmaktadır. Daha sonra bu renk açılmaları koyulaşarak nekrotik alanları oluşturmaktadır (15). Enfekteli alanlarda hastalık öbek öbek renk açılması şeklinde kendini göstermektedir (Şekil 2.2.). Hastalığa adını veren nekrotik sarı damar semptomu doğal koşullarda ender olarak görülmektedir (15).



**Şekil 2.2.** Rhizomania hastalığının yapraklarda neden olduğu sararma, köklerde sakallanma ve kök kesitindeki nekrotik halkalar (16).

Virüs köklerde yerleştiğinden yaprağa az oranda taşınmaktadır (17). Bitkiler erken dönemde enfekte olduklarında karakteristik semptomlar gözlenmektedir. Ana kök ucu ölmekte ve lateral kökler aşırı derecede çoğalmaktadır. Yeni oluşan yan kökler de sonrasında enfekte olmakta ve ölmektedirler. Mevsim boyunca sürekli yeni yan kökler olduğundan kök ucu bir sakal görünümü almaktadır (11). Kökler tipik bir şekilde

enfeksiyon noktasında daralmakta ve kök bir kadeh görüntüsünü almaktadır. Bu durumda ya hiç kök sakallanması görülmemekte ya da sadece kökün daralan kısmının en alt parçasında sakallanma oluşabilmektedir. BNYVV ile enfekteli bitki yumruları eğik veya yukarıdan aşağıya dik olarak kesildiğinde iletim dokusu halkalarının portakal rengi ya da kırmızımsı kahverengi olduğu ve lifleşip odunsu bir yapıya dönüştüğü görülmektedir (17). (Şekil 2.2.).

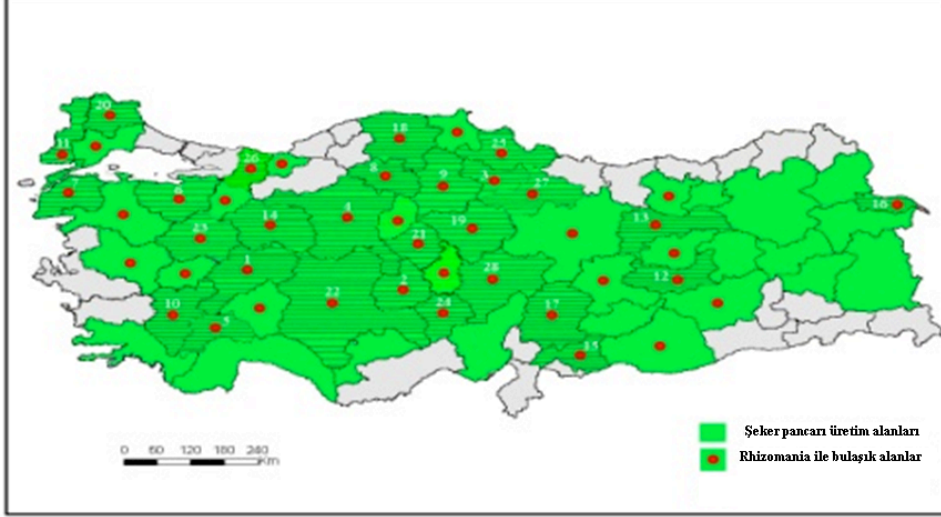
#### 2.2.4. Coğrafi Dağılımı

Hastalık ilk defa 1954 yılında İtalya'nın Po ovası ve Adige vadisinde Canova tarafında gözlenmiştir (16). Rhizomania'nın ilk belirlenmesini takiben dünyada hastalığın tespit edildiği diğer ülkeler sırasıyla Çizelge 2.1.'de görülmektedir.

**Çizelge 2.1.** Rhizomania (BNYVV)'nin ülke ve yıl bazında dağılımı (16)

Ülke	Yıl	Ülke	Yıl
İtalya	1952	Macaristan	1982
Japonya	1965	Bulgaristan	1983
Hırvatistan	1971	Hollanda	1983
Fransa	1971	İsviçre	1983
Yugoslavya	1972	Belçika	1984
Yunanistan	1972	Birleşik Krallık	1987
Almanya	1974	Türkiye	1987
Çin	1978	İspanya	1988
Slovakya	1978	İsveç	1997
Avusturya	1979	Suriye	1998
Kazakistan	1979	Danimarka	2000
Romanya	1979	Polonya	2002
Rusya	1979	Mısır	2003
Ukrayna	1979	İran	2004
ABD	1981	Fas	2005

Ülkemizde hastalığın varlığı ilk kez Dr. Koch tarafından Amasya Şeker Fabrikası'nın Erbaa ve Taşova bölgeleri ile Alpullu Şeker Fabrikası'nın Keşan ve Uzunköprü bölgelerinde tespit edilmiştir (4).



Şekil 2.3. Türkiye’ de Rhizomania ile bulaşık alanlar

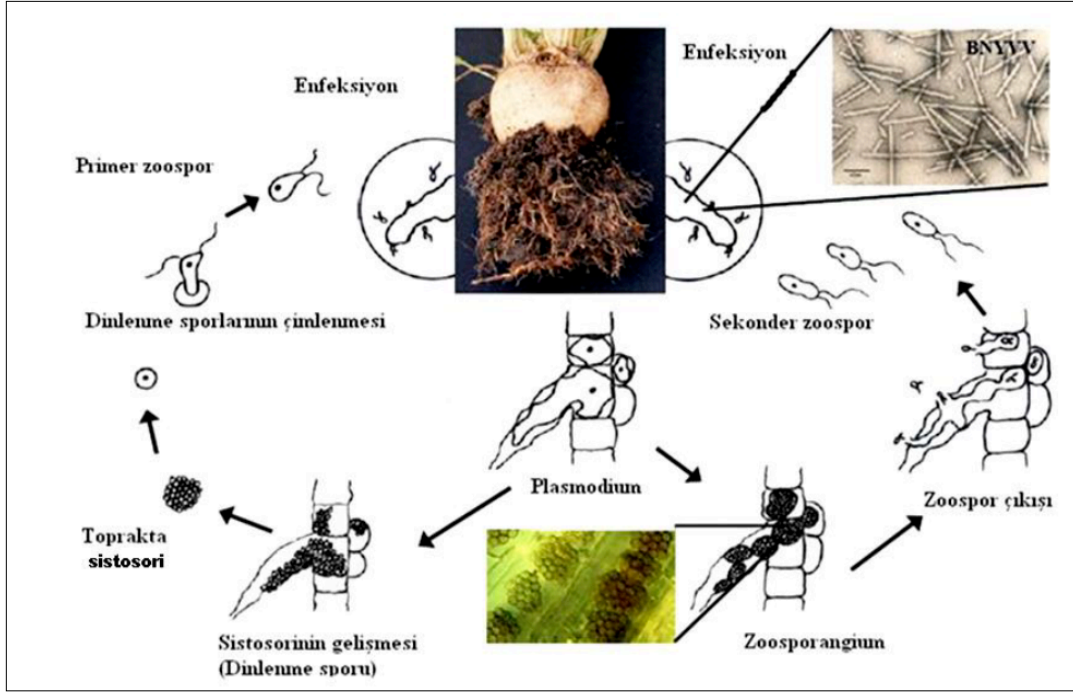
Bugüne kadar Türkiye’de pancar üretimi yapılan alanların neredeyse tümünde bulaşıklık tespit edilmiştir (Şekil 2.3.).

#### 2.2.5. Virüsün Vektör *Polymyxa betae* Keskin ile Taşınması ve Enfeksiyonu

Toprak kökenli obligat parazit olan vektör fungus *P. betae*, *Plasmodiophoromycetes* sınıfının bir üyesi olup ilk olarak Dr. Bahattin Keskin tarafından teşhis edilmiş ve *P. betae* olarak adlandırılmıştır (18). Daha sonraki çalışmalarla fungusun BNYVV'yi de taşıyabildiği belirlenmiştir (18). *Polymyxa betae* Keskin'nin konukçu dizisi, *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Caryophyllaceae* ve *Portulacaceae* familyası türlerini içermektedir. Yakın zamana kadar funguslar alemi içerisinde Myxomycota bölümünde yer alan vektör son taksonomik gruplandırma ile ayrı bir alem (Protozoa) içerisine dahil edilmiştir (19).

Fungus, toprakta çok uzun yıllar (yaklaşık 15 yıl) sporosori adı verilen kalın duvarlı spor kümeleri halinde kalabilmektedir. Daha sonra bu dinlenme sporları çimlenerek primer zoosporları oluşturur. Primer zoosporlar bitki dokusuna temas etmeleri durumunda kamçılarını kaybederek enkist hale dönüşürler ve yaklaşık 2 saat sonra zoosporların içeriği bitki dokusuna aktarılır. Bitki dokusu içerisinde zoosporların çekirdekleri bölünmeye

başlar ve plasmodium oluşur. Oluşan plasmodiumların %50'den fazlası virüs taşımasına karşın, oluşan tüm zoosporların ve sistosorilerin bir kısmının virüs içermediği bildirilmiştir (20). Bu plasmodiumdan ya sekonder zoosporların serbest kalacağı zoosporangium ya da sporosorinin oluşacağı sporogonik plasmodium oluşur. Bir döngü yaklaşık 60 saat içerisinde tamamlanır (17) (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. *Polymyxa betae* Keskin'nın yaşam döngüsü (17)

### 2.3. BNYVV'YE ve Yabani Pancar Dayanıklılığına Yönelik Biyoteknolojik Yaklaşımlar

#### 2.3.1. Nematoda Dayanıklılık Islahı

Şekerpancarı kist nematodu, *Heterodera schachtii* Schmidt, dünyada ve ülkemizde kök bölgesinde zarar yaparak, önemli ürün kayıplarına (~%30) neden olmaktadır. Nematodların çevreye toksik etkisinin olması, ayrıca münavebe uygulaması ve tuzak bitki kullanılması durumunda bile 400-500 adet yumurtanın kist içinde toprakta 10 yıldan fazla yaşayabilmesi nedeniyle günümüzde nematod zararına karşı en etkili çözüm dayanıklı çeşitlerin ıslah edilmesidir. Bunun için ise nematoda dayanıklılık genlerini taşıyan yabancı pancarlar kullanılmaktadır. *Beta vulgaris* (şeker pancarı) türü nematoda karşı hassas iken, *Beta maritima*'da dayanıklılık poligenik olup kısmi bir dayanıklılık söz konusudur. Asıl



dayanıklılık kaynağını *Procumbentes* seksiyonu (*Beta patellaris*, *Beta procumbens*, *Beta webbiana*) oluşturmakta ve bu türlerde dayanıklılık major gen(ler) tarafından kontrol edilmektedir. Dayanıklılık genlerinin aktarılması amacı ile *Procumbentes seksiyonu* ile *B. vulgaris* arasındaki melezleme çalışmalarında ise kromozom uyumsuzlukları nedeni ile değişik monosomik ( $2n=18$ +yabani kromozom,  $2n=18$ +kromozom parçası) hatlar ortaya çıkarken, yabani pancar dayanıklılık genlerinin *B. vulgaris* genomuna entegre olduğu translokasyona sahip diploid ( $2n=18$ ) hatlar dayanıklı-verimli hatları oluşturmaktadır. Günümüzde nematoda dayanıklı pancar ıslahının kaynağını oluşturan, dayanıklılık translokasyona sahip hatlar çoğunlukla *B. procumbens* ( $\times$  *B. vulgaris*) melezlemelerinden elde edilmiştir (21). Ayrıca *B. patellaris*'in kromozom 1 (*HsI<sup>pat1</sup>*) ve *B. webbiana*'nın kromozom 7 bölgesini (*HsI<sup>web7</sup>*) içeren translokantların dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Diploid hatlardaki büyük translokasyonların melezlemelerle çeşitlere kolay aktarılamamaları ise, araştırmacıları translokasyon bölgelerinden genlerin izolasyonuna yöneltmiştir. 1997 yılında, *B. Procumbens*'in 1. kromozomundan dayanıklılığı oluşturan *HsI<sup>pro-1</sup>* geni klonlanmış ancak yeterli dayanıklılık sağlanamamıştır. 1997-2013 arasında da, bu bölgede bulunduğu savunulan ikinci bir genin (*HsI-2*) belirlenmesine yönelik yoğun çalışmalar yürütülmüş, fakat henüz somut bir sonuç alınamamıştır (22).

### 2.3.2. Kuraklık Tolerans Islahı

Ülkemizin de yer aldığı Akdeniz kuşağında şeker pancarı alanlarında sulama zorunlu olup, kurak koşullar %40'lara varan bir ürün kaybına neden olmaktadır. Sulanan alanlarımızın ise önemli bir payı (yaklaşık %5-6'sı) pancar üretimine ayrılmıştır. Kuraklıkla stoma kapanması artmakta, CO<sub>2</sub> asimilasyonu azalmakta ve dolayısıyla fotosentezle üretilen karbohidrat miktarı (özellikle sakkaroz) azalmaktadır. Ayrıca, kuraklık koşullarında prolin yerine osmoprotektant olarak biriken glisin betain, stres sonrasında da kökte kalarak, işlenme aşamasında kristalleştirmeyi inhibe etmekte ve şeker kalitesini bozmaktadır. Diğer taraftan, tolerant olmayan çeşitlerde, fazla sulama ile kalsiyum halkalarına ait hücreler su ve sakkaroz dışı bileşiklerle dolmakta ve böylece sakkaroz birikimi azalmaktadır. Sonuç olarak, tolerant olmayan çeşitlerde sulama yapılmadığında hem bitki gelişimi yavaşlamakta hem de şeker miktarı ve kalitesi düşmektedir. *Beta vulgaris* genotiplerinin kuraklığa toleransı düşük olup, tolerant hat/çeşit geliştirmede yabani pancar gen kaynaklarının kullanımı tek yol olarak görünmektedir (22). Bu açıdan bakıldığında ülkemiz gen

kaynakları arasında yer alan *B. corolliflora*, *B. macrorrhiza* gibi türlerin kültür çeşitleri ile melezlenerek tolerant hatların elde edilmesi büyük önem taşımaktadır (23).

### **2.3.3 Rhizomania Dayanıklılığında Sitoplazmik Erkek Kısır (CMS) Hatları ve Paraleli O-tip bitkilerin MAS Markırlar ile Seleksiyonu**

Şeker pancarında CMS bitkileri, ilk defa 1945 yılında F.V. Owen tarafından bulunmuş, ve bu devam ettirici bitkiler Owen-tip bitki anlamına gelen O-tip bitkiler olarak adlandırılmıştır (24). Steril sitoplazma (S), homozigot resesif şartlarda sadece iki çift allelin varlığında ortaya çıkmakta ve CMS bitkileri Sxxzz genotipine sahip olurken diğer kombinasyonları fertil veya yarı fertil döller oluşturmaktadır (25). O-tip bitki seçimi aşamasında popülasyondaki her bir bitkinin CMS test bitkisi ile melezlenmesi ve elde edilen melezlerin erkek kısırlık açısından test edilmesi gerekmektedir. O-tip bitki mümkün olduğu kadar yüksek şeker varlığı, yüksek genel kombinasyon kabiliyeti, biyotik ve abiyotik streslere tolerans, yüksek tohum verimi ve yüksek monogermlik gibi birçok iyi özelliği bir arada barındırmalıdır (26).

Dayanıklı ve O-tip sitoplazmik erkek kısır ebeveyn hatlarının ve çeşitlerinin geliştirilmesinde, klasik ıslah çalışmalarındaki işgücü miktarını ve ıslah süresini azaltmak amacı ile birçok bitki türünde olduğu gibi şeker pancarında da hibritlerin erken dönemde seçim yapılmasını sağlayarak zaman kaybını azaltan Markıra Dayalı Seleksiyon (MAS, Marker Assisted Selection) yaklaşımı önem kazanmaktadır. MAS yaklaşımında; genetik erkek kısırlığını (CMS) mekanizmasını kontrol eden, rhizomaniya dayanıklılıkta rol oynayan bitki genleri ile bağlantılı (linkage), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeat), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) gibi DNA markırları harita popülasyonlarında tespit edilmekte, daha sonra bu DNA markır bandı izole edilerek dizilenmekte elde edilen dizilere primerler oluşturularak, kodominat özellikte gen ilişkili SCAR (Sequenced Characterized Amplified Region) markırları oluşturulmaktadır. SCAR markır geliştirdikleri genetik haritalama çalışmalarında CMS (genetik erkek kısırlığı) gen/genleri, Rhizomania dayanıklılık gen/genlerinin tümden klonlanmasına başlangıç noktası oluşturabileceği gibi, şeker pancarı ıslahında Rhizomania'ya dayanıklı ebeveyn ve F<sub>1</sub>'lerde yine genetik erkek kısır F<sub>1</sub>'lerde hızlı tarama ile moleküler açıdan erken seleksiyon sağlamaktadır. Diğer bir ifade ile SCAR markırlar veya bunların

geliştirildikleri, ancak SCAR'a dönüştürülmeyen moleküler markırın (AFLP, RAPD bandı veya bölgesi vb.) genle ilgili bandı şeker pancarında markıra dayalı erken seleksiyon (MAS) çalışmalarına olanak sağlanmaktadır.

O-tip sitoplazmik erkek kısırlıkta rol oynayan *Rfl* genine (fertility restorer gene) yönelik moleküler çalışmalara bakıldığında; Moritani vd., (27), BSA (Bulk Segregation Analysis) dayalı haritalama çalışmasında *Rfl*'e yakın bağlantı gösteren 8 AFLP ve 2 RAPD markırını tespit etmişlerdir. Harita popülasyonunda gene ait bu AFLP markırlarından mAFEM972 ve mAFEM985 AFLP markırları ile RAPD'den dönüştürülmüş AB-18, AD-11 STS markırları fertil ve steril bitkiler açısından segregasyon göstermiş ve MAS markır olarak iki popülasyonun birbirinden ayrımını sağlamıştır. Diğer taraftan moleküler çalışmalar Owen tip erkek kısırlığının mitokondriyal genom ile bağlantılı olduğunu ortaya koymuştur. Şeker pancarında Owen-CMS'ye yönelik 6 adet mtRNA gen bölgesi (*cox1*, *cox2*, *atp1*, *atp6*, *rps3* and *orf324*) belirlenmiştir. Bunlardan *cox1* transkripti CMS steril ve fertil genotiplerde ifade farklılıkları göstermiştir (27). Ayrıca Moritani vd., (27), tarafından geliştirilen 5 adet CAPS markırını fertil ve steril bitkilerin tanımlanmasında MAS amaçlı kullanılabilmektedir.

#### **2.3.4. Rhizomania Dayanıklılık Genleri MAS Markır Seleksiyonları**

Rhizomania dayanıklılığında temel olarak farklı kaynaklardan köken alan 2 sorumlu genin (*Rz1* ve *Rz2*) varlığı bilinmektedir (14). Ancak şeker pancarının 3. kromozomunda bulunduğu varsayılan *Rz3*, *Rz4* ve *Rz5* genlerinin üzerinde de haritalama çalışmaları sürdürülmektedir.

BNYVV'ye Holly tipi dayanıklılıkta *Rz1* genine ait değişik allellerin etkili olduğunu bildiren Barzen vd., (28), tarafından yapılan BSA (Bulk Segregation Analysis) dayalı haritalama çalışmalarında 4. bağlantı grubu üzerinde yer alan ve gen uzaklığı 1.4 cM olarak belirlenen 12 RAPD markırını bulmuşlardır. Bunlardan F6-1050 ve N9-600 markırları daha sonra dizilenip SCAR markır F61050 ve 9600'a dönüştürülmüştür. Holly tip dayanıklılıkta *Rz1* geni ile bağlantılı olarak SCAR-F6'nın her zaman bulunduğunu SCAR-N9'un ise bulunmadığını bildirmişlerdir. Bitkilerde MAS taranması için F6-N9 veya F6 diğer RAPD markırlarla kullanılabileceği belirtilmiştir. Amiri vd., (29), WB41 ve Holly-1-4 popülasyonunda yaptıkları genetik haritalama çalışmaları sonucu *Rz1* ile bağlantılı AB6-15 RAPD markırını elde edilirken bu gene uzak ancak *Rz2* ile yakın bağlantı gösteren bir diğer RAPD (AB2-2-1800) markırını tespit etmişlerdir. Bu markırın WB41 F2

populasyonunda *Rz2rz2* ve *Rz2Rz2* allelerin segregasyonunu araştıran araştırmacılar WB41 dayanıklılığında dominat bir genin rol oynadığını savunmuşlardır. Grimmer vd., (30), *Rz1* dayanıklılığında Holly populasyonunun sorumlu olduğunu bildirirlerken, *Beta vulgaris* subsp. *maritima* kökenli pancar populasyonu olan WB42'nin *Rz2* dayanıklılığından ve WB41 populasyonun ise *Rz3* dayanıklılığından sorumlu olabileceğini bildirmişlerdir ve Rhizomania'ya karşı *Rz3* geninin dirençliliği taşıyan WB41 populasyonunda genetik haritalama çalışmaları yapmışlardır. Haritalama *Rz3* geninin, *Rz1* ve *Rz2*'nin haritalandığı kromozom 3'te olabileceğini ancak *Rz2* ve *Rz3*'ün aynı genler olabileceğini belirtmişlerdir. *Rz3* ile ilgili 2 SSR (MS0303 ve MS0331) markırının bağlantılı olabileceğini belirten araştırmacılar bu markırlarının heterozigot/homozigot durumuna göre *Rz3* ile ilişkilendirilebileceğini vurgulamışlardır. *Rz3/Rz3* veya *rz3/rz3* homozigot SSR allel verilerinin hassaslarda *Rz3/rz3* heterozigot allel verilerinin ise dayanıklı bireylerde görülebileceğini belirtmişlerdir. (31) ise, beta aksesyonu olan 4 populasyon [Holly-1-4 (*Beta vulgaris*), R128 (*Beta vulgaris*), R104 (*Beta maritima*), ve WB42 (*Beta maritima*)] üzerinde yaptıkları çalışmalarda 2 RAPD markırını geliştirmişlerdir. Holly-1-4, R104 and R128 populasyonlarının dayanıklılık geninin (*Rz1*) aynı allelini taşıdığını belirten araştırmacılar operon-RAPD markırlarının (OP-01 ve OP-02) dayanıklı ve hassas bireylerin ayırımında MAS olarak kullanılabilceğini bildirmişlerdir. Ayrıca bu markırlarının MAS olarak kullanılabilceği, dönüştürüldükleri STS markırını validasyonları ile de tespit edilmiştir.

### **2.3.5. BNYVV Tiplendirme ve Tanı alışmaları**

BNYVV virüsü, içerdiği RNA kompozisyonuna göre A, B ve P olmak üzere temelde 3 patojenite sınıfına ayrılmaktadır (13,14). ELISA ve RT-PCR'a dayalı virus tanı çalışmalarında baz alınan tiplere ve RNA kompozisyonlarına yönelik temel çalışmalar řu şekilde özetlenebilir: Tip A, Avrupa lkeleri, Amerika, Çin ve Japonya' da görülürken tip B daha sınırlı alanda (daha çok Almanya ve Fransa) yayılım göstermektedir. P tipi olarak adlandırılan grup ise ek bir RNA (RNA5) içermekle birlikte ilk olarak 1997 yılında Pithivier-Fransa yakınlarında, sonrasında 2000 yılında Kazakistan ve 2007 yılında İngiltere'de tespit edilmiştir. Japonya, Çin ve Almanya'da ise RNA5'i içeren diğer izolatlar tespit edilmiştir (14). Doğu Asya lkelerinde (Japonya, Çin) görülen BNYVV tiplerinin Avrupa lkelerinde görülen A ve B tipleri ile benzer olduğu fakat birebir aynı olmadıkları belirtilmektedir (13). Çin ve Japonya'da RNA5 içeren örneklerin A veya B

tipleri ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (13). Ayrıca ayrı BNYVV varyantları incelendiğinde RNA5'in Fransa ve Kazakistan'da tanımlanan P tipi ile ilişkili ve RNA5 içeren örneklerin içermeyenlere göre daha patojenik olduğunun kanıtı olduğu belirtilmektedir (13). A, B ve P tipleri başlangıçta RFLP ve SSCP analizleri ile tanımlanmıştır. Avrupa ülkelerinde görülen A, B ve P tiplerindeki referans dizi farklılıkları ve RNA içeriklerindeki farklılıklar "International Committee on Taxonomy of Viruses, VIII report" komitesinin 8. raporunda listelenmiştir (13). Tiplendirme çalışmalarına bakıldığında sözkonusu bildiride belirtilen ve referans olarak kullanılacak A, B, P tipleri dikkate alınarak karşılaştırmalar üzerine yoğunlaşmıştır. Bu doğrultuda A, B ve P tiplerinin Kazakistan da tanımlanması için F72 (Fransa P tipi), N7 (Hollanda A tipi) kullanılan referans tiplerdir. Bir başka araştırmanın izolatlarının taranmasında, referans izolat dizisi olarak RNA2 için: Fransa P tipi ve Kazakistan P tipi, RNA3 için: Hollanda A tipi, RNA4 için: Fransa P tipi, Kazakistan P tipi, Hollanda A tipi ve RNA5 için: Kazakistan P tipi baz alınmıştır (2). Ülkemizden yapılan moleküler çalışmalarda ise genel RNA 3 üzerinde yoğunlaşmıştır. 6 adet izolat üzerinde yapılan çalışmada (T1, T8, T9, T11, T19, T24) RNA3 içerikleri hem izolatlar arasında hem de temelde F2 (Fransa-B tipi), S (Japonya-A tipi), Kas2 (Kazakistan-P tipi) referans izolatları ile karşılaştırılarak araştırılmıştır. Tokat'tan toplanan izolatların Kas2 (Kazakistan) izolatları ile daha yakın, F2 (Fransız) izolatları ile daha uzak ilişkili olduğu tespit edilmiştir (13). İngiltere'de yapılan bir çalışmada RNA5 içeren izolatlar incelenirken, UK-FF ve UK-MH tiplerinin tanımlanması ve referans izolatlarla olan benzerlik oranlarının belirlenmesinde RNA2, RNA3, RNA4 için S (Japonya-A tip) ve RNA5 için F72 (Fransa-P tip) referans izolatlarının RNA dizileri kullanılmıştır (13). Fransa'da F97, F98, F99, F100, F101 tiplerinin RNA içeriklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada RNA1, RNA2, RNA3 için F2 (Fransa-B tip), RNA4 için S (Japonya-A tip), RNA5 için F72 (Fransa - P tip) referans izolatlarının RNA dizilerine yönelik bilgiler karşılaştırmada kullanılmıştır (12). (32), tarafından A ve B tipleri için RNA2 açısından 72 izolat (Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika) üzerinde yapılan çalışmada A tipi için S (Japonya) ve B tipi için F2 (Fransa) izolatları referans alınmıştır.

### **2.3.6. Yabani Pancar Gen Kaynaklarında Dayanıklılık Düzeyleri/Real Time PCR**

Virüsün daha patojenik suşlarının ortaya çıkması veya BNYVV'nin mutasyona uğraması durumunda virüsün dayanıklı pancar kaynaklarında dahi ciddi ölçüde hastalık yapabileceği düşünülmektedir (33,34). Yüksek seviyede bir dayanıklılığın gözlemlenmesine rağmen

hastalığın şiddetli olduğu yerde *Rz1* dayanıklılığı yeterli olmayabilmektedir (33). Bu nedenle şeker üretiminin sürekliliği ve bitki veriminin korunması-artırılması için, bir çeşitte birden fazla dayanıklılık geninin kombine edilmesi gerekir (33). Dayanıklılık kaynaklarının başında ise yabancı pancarlar gelmekte olup, *P. betae* vektörüne karşı *Beta*, *Corollinae* ve *Procumbentes* seksiyonları gibi yabancı türlerde bazı dayanıklı formların kullanımı ile dayanıklılık bakımından ek avantajlar sağlamaktadır (35). “Alba P” (36). “Rizor” (36) ve “Holly” tipi (33) çeşitleri dayanıklılığın ilk kaynakları olarak kabul edilmektedir. Daha sonra, Danimarka’dan toplanan kıyı pancarı (sea beet) WB42’nin dayanıklı olduğu görülmüş (15) ve *Rz2* olarak adlandırılan bu genin *Rz1* genine bağlı dominant bir genle kontrol edildiği (31) ve farklı bir mekanizmaya sahip olduğu belirtilmiştir (31). Son zamanlarda *Beta maritima*’da C28, R04, R05, C50, WB151, WB169 (15); WB41 ve WB 258 genotipleri (37,38), gibi *Rz3*, *Rz4*, *Rz5* bitki genlerini taşıyan başka dayanıklı kaynaklar da tespit edilmiştir (34).

Ticareti yapılan dayanıklılık tipleri Alba, Rizor ve Holly’nin *Beta maritima*’dan elde edildiği görülmektedir (36). Rizor ve Holly’deki monogenik dayanıklılık aynı kromozomal bölgede haritalanmış (31,36) ve monogenik dayanıklılık kaynağı taşıyan genotipler farklı ifade seviyeleri göstermişlerdir (31). Tek bir dayanıklılık geni (*Rz1*) taşıyan çeşitlerin dayanıklılıklarının sürekli olamayacağı endişesi, yeni dayanıklılık kaynaklarının bulunmasını önemli kılmaktadır. İslahdaki son gelişmelerle *Rz1* ve *Rz2* genlerinin her ikisini birlikte içeren çeşitler elde edilmiş ve bu çeşitler BNYVV’nin mutasyona uğradığı yerlerde oldukça yüksek performans göstermişlerdir (33). BNYVV dayanıklılığı için stabil kaynaklar bulunamazsa, virüsün kontrolü için alternatif yaklaşımların benimsenmesi kaçınılmaz olacaktır.

Diğer taraftan ülkemiz pancarın muhtemel orijin alanlarından birisi olup, *Beta* seksiyonunun çoğu türleri ile *Corollinae* seksiyonunun bilinen tüm türleri Türkiye’de yayılış göstermektedir. Türkiye’de kültür formları da farklılık göstermekte ve farklı kullanım amacına göre farklılık içermektedir. Şeker pancarlarının eski çeşitleri yanında Anadolu’da nesiller boyu kullanılagelen kök ve yaprak tipi sebze pancarları da mevcuttur. Ülkemizde bulunan zengin yabancı gen kaynaklarının korunmasına ve koleksiyonuna yönelik, Ulusal program çerçevesinde toplanan yaklaşık 260 pancar Ulusal Gen Bankasında (Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü, İzmir) muhafaza edilmektedir. Ticari pancar varyetelerinin ve ıslah hatlarının sürekli olarak ıslah çalışmalarında kullanılmasıyla

şeker pancarının (*Beta*) gen havuzu giderek daralmıştır (16). Bu nedenle ıslah programlarında genetik taban oluşturacak pancar türlerinin belirlenmesi, değerlendirilmesi ve kullanılmasıyla ilgili araştırmalar önem kazanmıştır. Şeker pancarının primitif formları ve yabancı akrabaları içerdikleri genetik varyasyon ile pek çok genetik ıslah çalışmaları için önemli bir potansiyele sahiptir (35,37). Özellikle şeker pancarının yabancı türleri bazı morfolojik özellikleri, baskı faktörlerine, hastalık ve zararlılara dayanıklılık ve bazı genetik özellikleri açısından ıslahçılarca aranılır olmuştur.

Virus tiplerinin belirlenmesinde metot olarak seçilen birçok araştırmada temel yaklaşım olarak uygulanan RT-PCR'a dayalı yöntemler virus tanısında etkin olarak kullanılmaktadır. Ancak yabancı popülasyonlar da dahil olmak üzere dayanıklı genotiplerin seçiminde virüsün çoğalmasını/virus genlerinin ifade analizlerini gösteren Real Time PCR uygulamaları önemli avantajlar sağlamaktadır. RNA2 ve RNA5 baz alınarak Harju vd., (39), tarafından 12 BNYVV izolatu üzerinde TaqMan probu ile gerçekleştirilen Real Time PCR ve RT-PCR karşılaştırması çalışmasında, TaqMan ile yapılan çalışmanın RT-PCR çalışmasından ve ELISA'dan yaklaşık 10,000 kat daha hassas olduğu belirtilmiştir (39).

#### **2.4. Bitkilerde Gen İfadesinin Belirlenmesine Yönelik Yaklaşımlar**

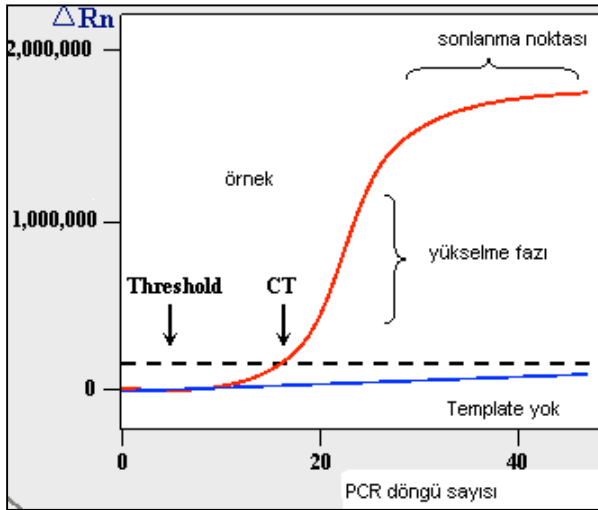
Biyotik ve abiyotik stres koşulları altında bitkide meydana gelen değişim ve rol oynayan mekanizmaların belirlenmesinde, gen ifade analizleri büyük önem taşımaktadır. Günümüzde farklı koşullarda, dokularda ifade edilen genlerdeki farklılıkların anlaşılması için geliştirilmiş birçok kapsamlı moleküler teknik bulunmaktadır. Bunlardan RNA temelli gen ifadesi analiz yöntemleri genel olarak; Northern Blot, Real Time PCR (RT-PCR), RNA mikroarray, SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) gibi teknikleri içermektedir.

##### **2.4.1. Real Time PCR (RT-PCR) (Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)**

Real Time PCR, nükleik asit amplifikasyonunun eş zamanlı olarak gözlenmesine olanak sağlayan ve temeli PCR teknolojisine dayanan analiz teknolojisidir. Bu teknolojiye ortamdaki DNA sarmalına bağlanan ve floresan ışığa yapan özel boyalar (SYBR Green, SYTO9, FAM, TAMRA gibi) kullanılarak, sinyal oluşturan prob dizileri yardımı ile ortamdaki amplifikasyon miktarı tespit edilebilmektedir. Her PCR döngüsü sonrasında, ortamda oluşan çift zincirli ürünün bu sayede miktarı belirlenebilmekte ve kantitatif analizleri yapılabilmektedir (40). Real Time PCR; çok sayıda örneğin aynı zamanda

analizine olanak sağlaması, amplifikasyonun erken evrelerde saptanabilmesi, agaroz jele gerek duyulmaması ve agaroz jelde rezolüsyondan dolayı ayırt edilemeyen ifade farklılıklarının rahatlıkla saptanabilmesi gibi çok sayıda avantajlara sahip bir yöntemdir.

RT PCR reaksiyonları; exponensiyal faz (yükselme fazı), linear faz (yüksek farklılık) ve plato faz (sonlanma noktası) olmak üzere 3 temel basamaktan oluşmaktadır (Şekil 3.1.). Exponensiyal fazda tüm reaksiyon içerikleri ortamda yeterli miktarda bulunduğundan etkinlik %100 olup, bu nedenle PCR ürün miktarı her döngüde iki katına çıkmaktadır. Linear fazda ise yavaş yavaş reaksiyon komponentleri azalmaya başlar bu nedenle PCR ürünlerinin oluşumunda azalma gözlemlenmektedir. Plateu fazda ise PCR ürün oluşumu tamamen sonlanmaktadır (41).



Şekil 3.1. Real Time PCR döngü aşamaları (41)

Real Time PCR'da; hibridizasyon problemleri, hidroliz problemleri ve SYBR green olmak üzere 3 çeşit prob (floresan ışımada görevli) kullanılmaktadır. Bunlardan hibridizasyon problemlerinin, 3' ucu (530 dalga boyu) floresan işaretli olup, 5' ucunda (640 dalga boyu) ise başka bir prob bağlıdır. 3' ucu normalde aldığı enerjiyi geri salmaktadır. Reaksiyon sırasında bu iki prob bir araya gelince (maksimum iki baz uzaklıkta) 3' ucundaki probun saldığı enerjiyi 5' ucundaki prob alır ve 640 dalga boyunda ışımaya (FRET-floresans rezonans enerji transferi) gerçekleşmektedir. Hidroliz problemleri ise dizi spesifik problemlerdir. Ortamda quenter (söndürücü) ve reporter (haberci) olmak üzere iki prob bulunmaktadır (89). Hibridizasyon problemlerinden farklı olarak ışımaya gerçekleşmesi için bu iki probun bir arada olmaması gerekmektedir. Reaksiyon sırasında uzama başlayıp quenter (söndürücü) parçalandığı zaman reporter (haberci) prob ışınması yaparak analize olanak



sağlamaktadır. SYBR green ise diziye spesifik olmayıp, ortamda çift zincir DNA'nın minör groove'ne bağlanarak ışığa gerçekleştirilmektedir (40).

Real Time PCR analizlerinde temel parametre eşik döngü değeri (threshold cycle = Ct)'dir. Bu değer gerçekleşen amplifikasyon sırasında tespit edilen floresan ışınımının eşik çizgisini kestiği noktadır. Başka bir ifade ile eşik döngü değeri reaksiyonda ilk anlamlı artışın gerçekleştiği noktayı (eksponensiyel faza ilk geçiş) belirtmektedir. Başlangıçtaki hedef DNA miktarı ne kadar fazla ise ilk anlamlı artış o kadar erken olacaktır. PCR ürünleri eksponensiyel faza o kadar erken girecektir (41). Böylece Real time PCR sırasında farklı örneklerde oluşan ürün miktarı Ct değerleri ile karşılaştırılabilmektedir (40). Ayrıca analizler sırasında standart tanımlama çalışmasında kullanılacak kontrol örneklerine ihtiyaç vardır. Kontrol gruplarından ifadesi olan bir örnek, seri dilüsyonları yapılarak, standart olarak tanımlanabilmektedir. Yapılan standart dilüsyonlar varsayılan konsantrasyon miktarları içermektedir. Bu nedenle bu standartlar kullanılarak konsantrasyonlara karşılık gelen dilüsyonların Ct değerleri belirlenerek, kantitasyon için gerekli olan regresyon eğrisi çizilmektedir. Bu eğri standart eğri olarak da ifade edilmektedir. Reaksiyonu gerçekleşen örneklerin Ct değerlerinin standart eğri üzerinde önceki yapılan dilüsyonlardaki hangi konsantrasyonu temsil ettiklerine bakılarak göreceli miktar tayini belirlenmektedir (40).

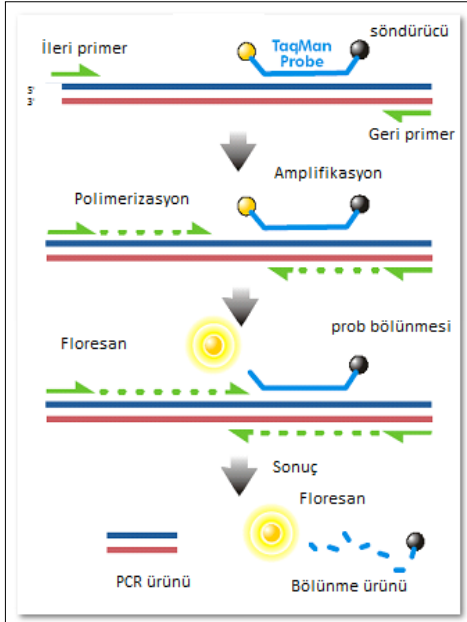
#### **2.4.2. Real Time PCR Çalışmalarında Kontrol (Housekeeping) Genleri**

Real time PCR çalışmalarında analiz edilen tüm örneklerin normalizasyonu için, çeşitli koşullarda ifade düzeyinin değişmediği bilinen (en az etkilenen) bir referans gene ihtiyaç vardır (40). Analizler sırasında ilgilenen genin ifade düzeyi, referans gen olarak seçilen housekeeping genin ifade düzeyine oranlanır. Böylece başta örneklere ait RNA'lardan elde edilen cDNA miktarlarının örnekler arası başlangıç farklılıkları ve deney aşamalarında meydana gelen farklılıklar normalize edilmektedir. Real time PCR çalışmalarında seçilecek housekeeping genin ifade düzeyinin değişim göstermemesi analizin doğruluğunu yükseltmektedir.

#### **2.4.3. Real Time PCR Özgül Belirleme Sistemleri / TagMan® Prob Yöntemi**

“TagMan® probe” yöntemi “Double-Dye Oligonucleotide”, “dual labeled probe” veya “5' nuclease probe” olarak da adlandırılmaktadır. “TagMan® probe” yöntemi çoğaltılmak

istenilen DNA'ya komplementer olan ve floresan işaretlenmiş tek zincirli bir prob içerir. Floresan işaretli probun 5' ucunda "fluorophore" (6-karboksifloresin= 6-FAM) ve 3' ucunda "quencher" (6- karboksitetrametil-rodamin= TAMRA) bulunmaktadır. 3' uçtaki baskılayıcı TAMRA boyası 5' uçtaki FAM boyasının sinyal oluşturmamasını engellemektedir. Amplifikasyon sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerinde primerler bağlanma bölgeleri arasına "Taq Man" problemleri bağlanırlar. Primerlerin bağlanmasının ardından yeni zincir oluşmaya başlar. Probun bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3 nükleaz aktivitesi ile FAM'ı probdan ayırır. Serbest hale geçen FAM sinyali oluşturur. DNA zincir sentezi uzamaya devam eder. Her bir döngüde ürün çoğalımı arttıkça floresan da ona bağlı olarak artmaya devam eder (Şekil 3.2.) (42)



Şekil 3.2. TaqMan Prob çalışma prensibi (42)

"TaqMan® probe" yöntemi kısa sürede kantitatif sonuç verebilmektedir. Ayrıca floresan ışığı yapan problemler kullanılarak hedef nükleik asitteki bölgeler çok düşük konsantrasyonda dahi olsalar (1/1000000 konsantrasyon) bölgeye spesifik olarak, doğruluk payı oldukça yüksek kantitatif analiz olanağı sağlamaktadır (42).

### 3. GEREKÇE VE AMAÇ

Ülkemizde şeker pancarı tarımının yapıldığı alanlarının tamamına yakını Rhizomania (kök sakallanması) hastalığı ile bulaşıktır. Ayrıca hastalık tarımsal uygulamalarla (sulama suyu, toprak ve toprak işleme aletleri vb) çok kolay yayıldığından, dünyada şeker pancarı üretiminin yapıldığı tüm alanlarda topraklar Rhizomania ile bulaşık durumdadır. Hastalık etmeni olan BNYVV virüsü (Beet Necrotic Yellow Vein Virus: Şeker Pancarı Nekrotik Sarı Damar Virüsü), genomdaki RNA zincirinin yapısına göre değişik tiplere (A, B ve P) ayrılmaktadır. Virüsün tiplerine ve coğrafik dağılımına yönelik değişik boyutlu konvansiyonel tanı (ELISA, RT-PCR) araştırmaları yürütülmektedir. Şeker pancarında ürün kaybına yol açan Rhizomania hastalığı, şeker veriminde %80'lere kadar azalmaya neden olmaktadır (16). Ülkemizin en ekonomik bitkilerinden birisi olan şeker pancarında; Rhizomania dahil abiotik/biotik koşullara dayanıklı milli "şeker pancarı hat ve çeşitleri" bulunmamaktadır. Ayrıca dayanıklılık geni/genleri taşıyan veya gen tespiti kaynağı olabilecek yabancı pancar gen kaynaklarımızın da Rhizomania dayanıklılığı yönünden taranmadığı görülmektedir.

Biyotik stres ıslah çalışmalarında ve yabancı popülasyonların taranması bitki genomunun yanı sıra, zararlıların (kontamine edilen viral, fungal etmenlerin bitkide çoğalma ve zarar yapmalarına yönelik gen ifade analizi vb.) genomu üzerinden de gerçekleştirilmektedir. Ayrıca yabancı popülasyonlarda seleksiyon için BNYVV virüsünün genomu (RNA 1, 2, 3, 4, 5 virüs gen bölgesi/bölgeleri) üzerinden yürütülecek biyoteknolojik çalışmalar, gen kaynaklarının taranması ve daha dayanıklı genotiplerin seçiminde etkilidir. Virüsün bitki hücresindeki bulunma oranı/düzeyi, daha önemlisi de virüsün çoğaldığının göstergesi olan virüs genlerinin ifadesini belirlemede konvansiyonel tanı yöntemleri yetersiz kalmaktadır. Dolayısıyla yabancı popülasyonlar da dahil olmak üzere dayanıklı genotiplerin seçiminde virüsün çoğalmasını/virüs genlerinin ifade analizlerini gösteren Real-Time PCR uygulamaları önemli avantajlar sağlamaktadır.

Yabancı pancar gen kaynaklarında Rhizomania'ya dayanıklı genotiplerin belirlenmesine yönelik olan bu tezde; BNYVV virüsü gen bölgelerinin Real Time PCR'a dayalı ifade analizleri ile *Beta* ve *Corollinae* seksiyonuna ait 35 yabancı genotipin dayanıklılık düzeylerinin belirlenmesi ve geleceğe yönelik araştırmalarda yabancı pancar dayanıklılık gen havuzunun oluşturulması amaçlanmıştır.

## 4. MATERYAL VE YÖNTEM

### 4.1. Bitkisel Materyal

Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Ulusal Gen Bankası'nda bulunan ve *Beta* ve *Corollinae* seksiyonuna ait 35 yabancı genotip kullanılmıştır (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. *Beta* ve *Corollinae* seksiyonuna ait bitki materyal listesi

Örnek No	Gen bankası No	Tür ismi	Toplandığı il
1	1	<i>Beta corolliflora</i>	Erzurum
2	2	<i>Beta corolliflora</i>	Kars
3	3	<i>Beta corolliflora</i>	Ağrı
4	81	<i>Beta corolliflora</i>	Bilecik
5	89	<i>Beta corolliflora</i>	Bilecik
6	4	<i>Beta maritama</i>	Antalya
7	6	<i>Beta maritama</i>	Adana
8	29	<i>Beta maritama</i>	İzmir
9	27	<i>Beta maritama</i>	İzmir
10	8	<i>Beta maritama</i>	Trabzon
11	5	<i>Beta adanensis</i>	Adana
12	25	<i>Beta adanensis</i>	Adana
13	28	<i>Beta adanensis</i>	Adana
14	39	<i>Beta adanensis</i>	Çanakkale
15	53	<i>Beta adanensis</i>	Adana
16	12	<i>Beta lomatogona</i>	Erzurum
17	224	<i>Beta lomatogona</i>	İsparta
18	13	<i>Beta lomatogona</i>	Erzurum
19	14	<i>Beta lomatogona</i>	Erzurum
20	222	<i>Beta lomatogona</i>	İsparta
21	260	<i>Beta trigyna</i>	Erzurum
22	47	<i>Beta trigyna</i>	Bolu
23	48	<i>Beta trigyna</i>	Kütahya
24	125	<i>Beta trigyna</i>	Eskişehir
25	227	<i>Beta trigyna</i>	Bilecik
26	19	<i>Beta intermedia</i>	Eskişehir
27	20	<i>Beta intermedia</i>	Eskişehir
28	21	<i>Beta intermedia</i>	Eskişehir
29	22	<i>Beta intermedia</i>	Eskişehir
30	23	<i>Beta intermedia</i>	Eskişehir
31	244	<i>Beta macrorhiza</i>	Erzincan
32	245	<i>Beta macrorhiza</i>	Erzincan
33	257	<i>Beta macrorhiza</i>	Kastamonu
34	197	<i>Beta macrorhiza</i>	Erzincan
35	239	<i>Beta macrorhiza</i>	Erzincan

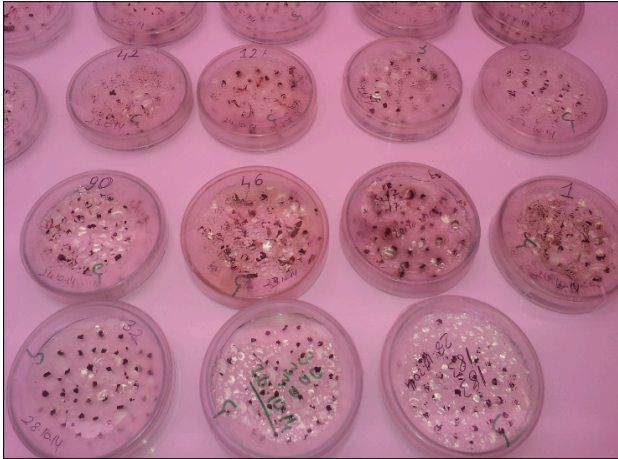
## 4.2. Yabani Pancar Tohumlarının Çimlendirilmesi

Yabani pancar tohumlarının sert kabuklarının yumuşayıp açılabilmesi için kuvvetli bir asit olan sülfirik asit  $H_2SO_4$  ile 3 saat boyunca muamele edilmiştir. Asitle muamele edilen tohumlar musluk suyu altında iyice yıkanarak asitten arındırılmıştır. Asitten arındırılan tohumlar gece boyu ılık suda bekletilmiştir. Ertesi gün tohum kabuklarının bistürü yardımıyla mikroskop altında açılmasına başlanmıştır. Sert olan tohum kabukları kaldırılarak embriyo zedelenmeden ortaya çıkarılmıştır. Embriyoları açılan tohumlar sırasıyla, tohum çimlendirme ortamı (Çizelge 4.2.), sürgün ortamı (Çizelge 4.3.) ve köklendirme ortamlarına (Çizelge 4.4.) alınmıştır.

**Çizelge 4.2.** Tohum çimlendirme ortamı içeriği

İçerik	Miktar
MS (Murashige and Skoog medium)	4.4 g/l
Sakkaroz	%3
BAP (benzil amino pürin)	1mg/L
Agar	5g/L

pH:5.8' e ayarlanarak ortam  $121^{\circ}C$ 'de 15 dk sterilizasyona tabi tutulmuştur. Açılan embriyolar ilk olarak açıklaması verilen tohum çimlendirme ortamına alınmıştır (Şekil 4.1.).



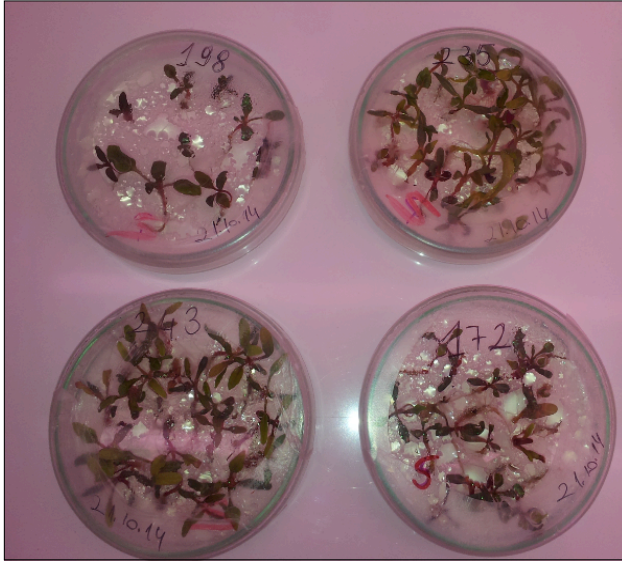
**Şekil 4.1.** Çimlendirme ortamındaki tohumların görünüşü

3-4 gün süre ile doku kültürü odasında 16 saat karanlık 8 saat aydınlık koşullar ve  $24^{\circ}C$ ' de çimlenen yabani tohumlar sürgün ortamına alınmıştır (Çizelge 4.3.).

**Çizelge 4.3.** Sürgün ortamı içeriği

İçerik	Miktar
MS (Murashige and Skoog medium)	4.4 g/l
Sakkaroz	%3
IBA (indol butirik asid)	1mg/L
Agar	8g/L

pH:5.8' e ayarlanarak ortam 121 °C'de 15 dk sterilizasyona tabi tutulmuştur. Çimlenen tohumlar sürgün ortamı içeren petrilere aktarılarak 1 hafta süre ile 16 saat karanlık 8 saat aydınlık koşullar ve 24 °C' de büyütülmüştür (Şekil 4.2.).

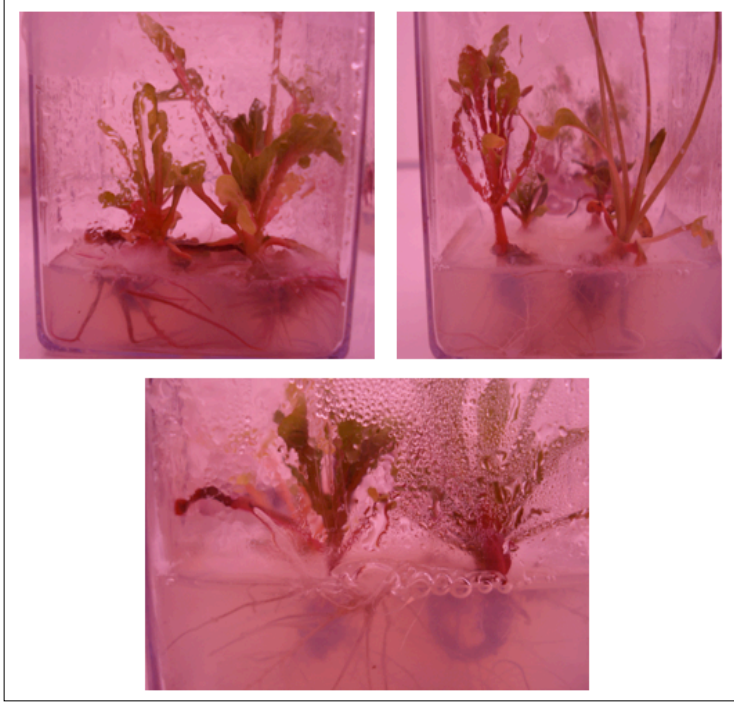


**Şekil 4.2.** Sürgün ortamına aktarılan bitkilerin görünüşü

**Çizelge 4.4.** Köklendirme ortamı içeriği

İçerik	Miktar
MS (Murashige and Skoog medium)	2.2 g/l
Sakkaroz	%3
IBA (indol butirik asid)	1mg/L
Agar	8g/L

pH:5.8' e ayarlanarak ortam 121 °C'de 15 dk sterilizasyona tabi tutulmuştur. Sürgün ortamında büyüyen bitkiler köklendirme ortamı içeren magentalara aktarılarak 4 hafta süre ile 16 saat karanlık 8 saat aydınlık koşullar ve 24 °C' de köklenmeleri sağlanmıştır (Şekil 4.3.).



**Şekil 4.3.** Köklendirme ortamına aktarılan bitkilerin görünüşü

Büyüyen ve köklenen bitkiler öncelikle steril çiçek toprağına aktarılarak toprağına adaptasyonları sağlanmıştır (Şekil 4.4.).



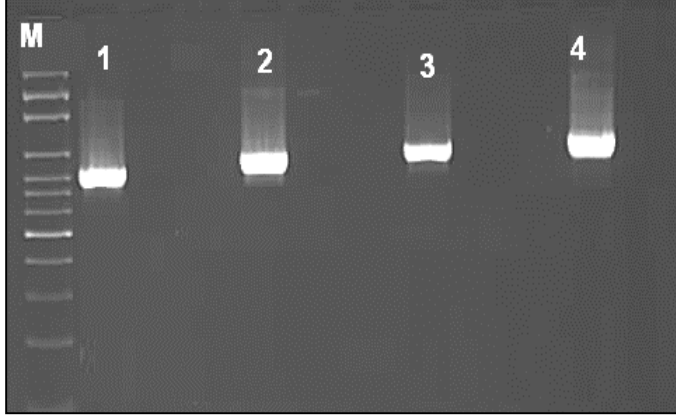
**Şekil 4.4.** Toprağına adaptasyonları sağlanan yabancı bitkilerin görünüşü

### **4.3. Yabancı Pancarlara Virüs Bulaştırma, ELISA Testi**

#### **4.3.1. Virüs Bulaştırma**

2 hafta süre ile toprağına adaptasyonu sağlanan yabancı bitkiler, TÜBİTAK 1003 (proje no: 113 O 096) projesi kapsamında ELISA testi ile bulaşıklığı ve RT-PCR reaksiyonları ile BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 varlığı (Şekil 4.5.) tespit edilen, “Ankara, Ayaş

Bölgesi, Balçıçek Kantarı” bölgesinden alınan toprağa virüs bulaştırılmak üzere şıştırılmıştır. 9 hafta süreyle iklim odasında 16 saat karanlık 8 saat aydınlık ve 24 °C koşullarında bulaşık toprakta virüs bulaştırılmıştır.



**Şekil 4.5.** Ankara, Ayaş Bölgesi, Balçıçek Kantarı toprağına ait 1-RNA1 (806 bç), 2-RNA2 (889 bç), 3- RNA3 (954 bç) ve 4- RNA4 (1033 bç), M: Markır bölgelerinin RT-PCR agaroz jel (%2) görüntüsü

9 hafta süreyle virüs bulaştırılan yabancı bitkiler musluk suyunda iyice yıkanmıştır. Toprakta arındırıldıktan sonra yabancı bitkilerin kökleri sıvı azotta ezilerek ELISA testi ve RNA (Real time PCR çalışmaları için) izolasyonuna kadar -80 °C’ de muhafaza edilmiştir.

#### 4.3.2. ELISA Testi

BNYVV bulaşıklığının tespiti amacıyla yabancı pancar köklerinden ELISA testi uygulaması yapılmıştır. ELISA testi, DAS-ELISA yöntemi Bioreba firmasının test protokolündeki açıklamaları göz önüne alınarak Şeker Enstitüsü Fitopatoloji Şubesi Viroloji Laboratuvarı’nda tamamlanmıştır.

##### Metot uygulaması:

- Bitki örnekleri tampon çözeltisinde ezilmiştir (1 g kök: 10 ml örnek tampon çözeltisi).
- Önceden kaplama tampon çözeltisinde 1:1.000 oranında sulandırılarak hazırlanan antiserum ile kaplanmış ELISA mikroyeplere 200 µl olacak şekilde ilave edildikten sonra mikroyeplere +4°C’de buzdolabında bekletilmiştir.
- Tampon çözeltisi ile 3 defa yıkandıktan sonra örnekler, 200’er µl mikroyeplere yerleştirilip gece boyu +4°C’de buzdolabında bekletilmiştir.



- Yıkama tampon çözeltisi ile 3 defa yıkandıktan sonra konjugat tampon çözeltisinde 1/1.000 oranında sulandırılan konjugat'tan 200 µl mikropleyitin her bir çukuruna ilave edilmiştir.
- Mikropleyitler, 6 saat +4°C'de buzdolabında bekletilmiştir.
- Tekrar yıkama tampon çözeltisi ile mikropleyit çukurları yıkandıktan sonra substrat tampon çözeltisi içerisinde 1 gr/ml olacak şekilde hazırlanan substrattan (p-nitrofenil fosfat) mikropleyit çukurlarına 200'er µl ilave edilmiştir.
- Mikropleyitler, substrat inkübasyonu için 37°C'de 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- Sonuçlar ELISA mikropleyit okuyucusunda (Bio-Rad Novapath Microplate Reader) 405 nm dalga boyunda absorbans değerlerinin alınmasıyla elde edilmiştir.
- Negatif kontrollerin absorbans değerlerinden 2 katı ve daha fazla değer veren örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir (43).

#### **4.4. Yabani Pancarlarda Taqman-Real Time PCR İle İfade Analizleri**

Real Time PCR uygulama reaksiyonları Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı'ndaki Light Cycler 480 (Roche) aletinde gerçekleştirilmiştir. Taqman-Real time PCR uygulamaları her yabani genotipe ait en az 3 bitkinin bulaşık kök karşımından en az 3'lü tekniksel tekrar şeklinde, '*Glutamine synthetase*' internal kontrol gen kullanılarak virüs RNA bölgeri; RNA1, RNA2, RNA3, RNA4'e yönelik olarak gerçekleştirilmiştir. Denemeler ihtiyaç duyulduğunda (RNA izolasyonu, Real Time PCR uygulamaları vb) yeterli sayıda tekrar edilmiştir.

##### **4.4.1. RNA İzolasyonu**

Real Time PCR reaksiyonu öncesinde; virüs bulaşık toprakta yetiştirilen yabani pancar köklerinden RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonları aşağıda metot açıklaması verilen Trizol yöntemine göre yapılmıştır.

##### TRİZOL protokolu

- Örnekler sıvı azotta ezilmiştir.
- 2 ml lik tüpe 1 ml trizol eklenmiştir.
- Üzerine 300-500 mg örnek eklenmiştir.

- Elle tüp kuvvetli bir şekilde sallanarak karışım sağlanır, vortekslenir ve örnekler oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir.
- Üzerine 250 µl kloroform eklenip karıştırılmıştır.
- Oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir.
- 14.000 rpm de 4<sup>0</sup>C de 10 dk. santrifüj edilir ve üst sıvı yeni tüpe aktarılmıştır.
- Üzerine 250 µl 1.2M NaCl, 250 µl 0.8 M Na-citrate ve 250 µl isopraponal eklenmiştir.
- 10 dk. oda koşullarında (tercihen -20<sup>0</sup>C de 10 saat) bekletilmiştir.
- 10.14.000 rpm de 4<sup>0</sup>C de 10 dk. santrifüj edilip, üst sıvı atılmıştır.
- Pellet %70 EtOH ile yıkanıp ve dikkatlice kurutulmuştur.
- 20-50 µl DEPC muamele edilmiş suda çözülmüştür.

Elde edilen RNA'lar %1'lik agaroz jelde görsel olarak kontrol edilerek, miktar ve saflık tayinleri ise, Nanodrop ND–1000 spektrofotometre aletinde belirlenmiştir.

#### **4.4.2. Total RNA'dan cDNA sentezi**

Real Time PCR'ın ilk aşaması olarak, örneklere ait cDNA sentezi yapılmıştır. cDNA sentezi için First Strand cDNA Sentez kiti (Roche, Cat no: 04897030001) kullanılmıştır.

##### RNA-Primer karışımının hazırlanması:

<b>İçerik</b>	<b>Hacim</b>
RNA (2000ng)	Değişken
Oligo (dt) Primer (50pmol/µl)	0.5 µl
Su (PCR grade)	Değişken
Toplam	6.5 µl

Karışım, termal cycler'da (Biorad marka) 65<sup>0</sup>C'de 10 dk denatüre edilip hemen buza alınmış, aşağıda verildiği şekilde hazırlanan Revers Transkripsiyon karışımı eklenerek, belirtilen reaksiyon koşullarında revers transkripsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

##### Revers transkripsiyon karışımının hazırlanması:

İçerik	Hacim	Reaksiyon Koşulları
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction buffer (5X)	2 µl	
RNase Inhibitor (40 ünite/µl)	0.25 µl	55 °C 30 dk
DNTP mix (10 mM)	1 µl	85 °C 5 dk
Transcriptor Reverse Transcriptase Enzimi (20 ünite/µl)	0.25 µl	
Toplam	3.5 µl	

cDNA sentezi sonrası Nanodrop ND–1000 spektrofotometre ile elde edilen cDNA miktarı ölçülerek miktar tayini yapılmıştır. Sentezlenen cDNA'lar Real Time PCR reaksiyonuna kadar -20 °C' de saklanmıştır.

#### 4.4.3. İfade Analizlerinde Kullanılan Taqman Primer/Prob Dizileri

Real-Time PCR ifade analizlerinde virüs RNA bölgelerine spesifik primer prob çiftleri kullanılmıştır. BNYVV RNA1, RNA3 ve RNA4 bölgeleri için primer/prob dizaynları yapılırken, RNA2 bölgesine yönelik Harju vd., (39), tarafından geliştirilen primer/prob çiftleri kullanılmıştır. Reaksiyonlar TaqMan Probes Master (Roche kat no: 4902343001) protokolüne göre yapılmıştır. İnternal kontrol (house keeping) olarak ise şeker pancarı '*Glutamin sentetaz*' genine yönelik primer/prob çiftleri kullanılmıştır. Virüs RNA bölgelerine yönelik ifade analizlerinde kullanılan primer/prob çifti dizileri Çizelge 4.5.'te belirtilmiştir.

**Çizelge 4.5.** İfade analizlerinde kullanılan Taqman prob/primer çifti dizileri

Bölge adı	Primer dizisi 5'...3'	Taqman prob dizisi 5'-FAM/TAMRA-3'
RNA1	i: gaataaaggccatgccacag	cctatcttgatgaaggtgtgtggtttctca
	g: caagaaccgacataagcaactc	
RNA2	i: catggaaggatatgtctcataataggtt	tgaccgatcgatggcccg

	g: aacactcacgacgtccgaaac	
RNA3	i: cctaatacgaacaatttcctc	caggtttacatggtgtgtttgtaaacacggttga
	g: tacaaccagagtgaaacca	
RNA4	i: gtcgttgatgttcctgtgtc	aaacacgtacacgtccaacgccaac
	g: ggcattaagaaagcaccag	
	g:ctgagtgacaccaagtg	
Glutamin sentetaz	i: aatacatttgattggaggatctg	caggtcgtgatagtgctcctcgatttgcta
	g: aattgctgggggtataagattac	

i: İleri primer, g: Geri primer

#### 4.4.4. Standart Eğrilerin Oluşturulması ve Optimizasyon Koşulları

Standart eğri çizimi için öncelikle ELISA bulaşıklık düzeylerine göre (yüksek bulaşıklık) virüs bulaşıklığı fazla olan örnekler belirlenmiştir. Bulaşıklık düzeyi yüksek olan örneklerden 29 gen bankası numarasına sahip numaralı örnek olan *Beta maritima*/İzmir, standart eğrilerin oluşturulması için belirlenmiştir.

29- *Beta maritima*' ya ait cDNA' dan 6 logaritmik konsantrasyon olmak üzere; 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 ve 1/100000 oranlarında seri dilüsyonlar hazırlanmış ve ölçümlerin değerlendirilmesi aşamasında Real Time PCR aletine ait analiz programı ile her bir primer için ayrı ayrı standart eğriler çizilmiştir. Virüs RNA bölgelerine ve *Glutamin sentetaz* genine ait Taqman primer/prob optimizasyon koşulları aşağıdaki Çizelge 4.6., Çizelge 4.7., Çizelge 4.8., Çizelge 4.9., Çizelge 4.10 ve Çizelge 4.11.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.6.** RNA1 bölgesine ait Taqman primer/prob optimizasyon koşulları

RNA1 bölgesi optimizasyon koşulları (Tm 52 °C)	
cDNA (200 ng)	2 µl
İleri primer (10 pmol)	1 µl
Geri primer (10 pmol)	1 µl
Taqman Prob (10 pmol)	0.2 µl
Prob master mix	5 µl
Toplam hacim	10 µl

**Çizelge 4.7.** RNA2 bölgesine ait Taqman primer/prob optimizasyon koşulları

<b>RNA2 bölgesi optimizasyon koşulları (Tm 57 °C)</b>	
cDNA	2 µl
İleri primer (10 pmol)	1 µl
Geri primer (10 pmol)	1 µl
Taqman Prob	0.2 µl
Prob master mix	5 µl
Toplam hacim	10 µl

**Çizelge 4.8.** RNA3 bölgesine ait Taqman primer/prob optimizasyon koşulları

<b>RNA3 bölgesi optimizasyon koşulları (Tm 52 °C)</b>	
cDNA	2 µl
İleri primer (10 pmol)	1 µl
Geri primer (10 pmol)	1 µl
Taqman Prob	0.2 µl
Prob master mix	5 µl
Toplam hacim	10 µl

**Çizelge 4.9.** RNA4 bölgesine ait Taqman primer/prob optimizasyon koşulları

<b>RNA4 bölgesi optimizasyon koşulları (Tm 52 °C)</b>	
cDNA	2 µl
İleri primer (10 pmol)	1 µl
Geri primer (10 pmol)	1 µl
Taqman Prob	0.2 µl
Prob master mix	5 µl
Toplam hacim	10 µl

**Çizelge 4.10.** *Glutamin sentetaz* genine ait Taqman primer/prob optimizasyon koşulları

<b>Glutamin sentetaz geni optimizasyon koşulları (Tm 52 °C)</b>	
cDNA	2 µl
İleri primer (10 pmol)	1 µl
Geri primer (10 pmol)	1 µl
Taqman Prob	0.2 µl
Prob master mix	5 µl
Toplam hacim	10 µl

Her primer/prob için optimize edilen koşullara göre hazırlanan karışım eklenerek Roche Light Cycler-LC 480 aletinde protokole uygun PCR programı koşullarında amplifikasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

#### 4.4.5. Örneklerin Alete Yüklenmesi

Her bir primer/proba ait örnekleri içeren cDNA'lar ile Taqman Prob Master Kit içerikleri karışımı alete ait 384'lük platelere yerleştirilerek plate 15000 rpm' de 2 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında Roche Light Cycler Sealing foil ile plate kaplanarak Roche Light Cycler 480 aletinde optimize edilen sıcaklıklar seçilerek koşturulmuştur. Alette kullanılan PCR programı aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.11.).

**Çizelge 4.11.** Real Time PCR Programı

<b>Program</b>					
<b>Program</b>	<b>Cycles</b>		<b>Analysis Mode</b>		
Pre incubation	Acquisition Mode	Cycle	Hold(hh:mm:ss)	Ramp Rate	
	None	1	00:10:00	4.8	None
Amplification	Acquisition Mode	Cycle	Hold(hh:mm:ss)	Ramp Rate	Quantification
95 °C	None	45	00:00:10	4.8	
TM °C	None		00:00: (15-30)	2.5	
72 °C	Single		00:00:01	4.8	

Cooling	Acquisition Mode	Cycle	Hold(hh:mm:ss)	Ramp Rate	
40°C	None	1	00:00:10	0.2	None

#### 4.4.6. Verilere Ait İstatistik Analizleri

TaqMan Real Time PCR reaksiyonları sonrasında, referans gen (*Glutamin sentetaz*) ile 35 adet yabancı pancar genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgelerine ait Ct değerleri, Rest 2009 (<http://rest-2009.gene-quantification.info/>) yazılımı ile karşılaştırılarak relatif gen ifadesi analizleri tamamlanmıştır. Yazılım tarafından uygulanan  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metodunda,  $p < 0.05$  anlamlılık düzeyinde, referans gen ile hedef genlerin kontrol Ct değerlerinin farkları “0”, reaksiyon etkinliği ise “1” olarak kabul edilerek analizler tamamlanmıştır.

## 5.ARAŞTIRMA BULGULARI

### 5.1. ELISA Testi

ELISA testi, yabancı pancar köklerinde BNYVV'nin varlığının araştırılmasında kullanılmıştır. DAS-ELISA yöntemi ve Bioreba firmasının test protokolündeki açıklamaları göz önüne alınarak Şeker Enstitüsü Fitopatoloji Şubesi Viroloji Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. 35 adet yabancı pancar genotipine ait, virus bulaşıklık düzeyleri ELISA testi sonuçları Çizelge 5.1.'de belirtilmiştir.

**Çizelge 5.1.** Yabancı pancar örneklerine ait ELISA testi sonuçları

Örnek No	Tür ismi	Toplandığı il	ELISA Testi Sonucu
1	<i>Beta corolliflora</i>	Erzurum	0,082
2	<i>Beta corolliflora</i>	Kars	0,077
3	<i>Beta corolliflora</i>	Ağrı	0,042
4	<i>Beta corolliflora</i>	Bilecik	0,048
5	<i>Beta corolliflora</i>	Bilecik	0,059
6	<i>Beta maritama</i>	Antalya	0,062
7	<i>Beta maritama</i>	Adana	0,039
8	<i>Beta maritama</i>	İzmir	0,031
9	<i>Beta maritama</i>	İzmir	0,036
10	<i>Beta maritama</i>	Trabzon	0,033
11	<i>Beta adanensis</i>	Adana	0,053
12	<i>Beta adanensis</i>	Adana	0,059
13	<i>Beta adanensis</i>	Adana	0,087
14	<i>Beta adanensis</i>	Çanakkale	0,080
15	<i>Beta adanensis</i>	Adana	0,059
16	<i>Beta lomatogona</i>	Erzurum	0,031
17	<i>Beta lomatogona</i>	Isparta	0'a oldukça yakın
18	<i>Beta lomatogona</i>	Erzurum	0,040
19	<i>Beta lomatogona</i>	Erzurum	0,035
20	<i>Beta lomatogona</i>	Isparta	0,043
21	<i>Beta trigyna</i>	Erzurum	0'a oldukça yakın
22	<i>Beta trigyna</i>	Bolu	0,043
23	<i>Beta trigyna</i>	Kütahya	0,030
24	<i>Beta trigyna</i>	Eskişehir	0,033
25	<i>Beta trigyna</i>	Bilecik	0,040
26	<i>Beta intermedia</i>	Eskişehir	0,038
27	<i>Beta intermedia</i>	Eskişehir	0,035
28	<i>Beta intermedia</i>	Eskişehir	0,031
29	<i>Beta intermedia</i>	Eskişehir	0,031
30	<i>Beta intermedia</i>	Eskişehir	0,035
31	<i>Beta macrorhiza</i>	Erzincan	0,031
32	<i>Beta macrorhiza</i>	Erzincan	0'a oldukça yakın

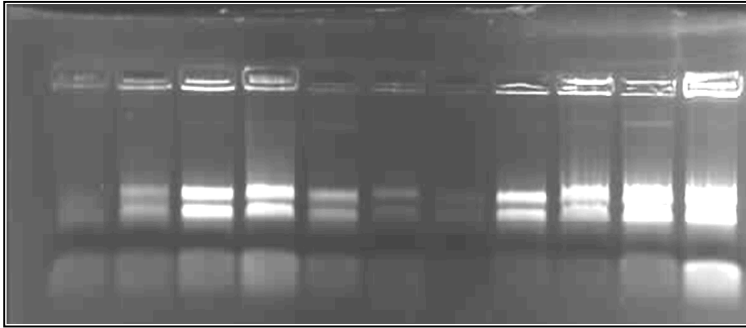


33	<i>Beta macrorhiza</i>	Kastamonu	0,038
34	<i>Beta macrorhiza</i>	Erzincan	0,029
35	<i>Beta macrorhiza</i>	Erzincan	0,033

Yüksek veya düşük ELISA bulaşıklık değerleri belirlenen genotipler hem *Beta* seksiyonuna hem de *Corollinae* seksiyonuna ait olup genotipe bağlı olarak değişim belirlenmiştir. Seksiyonlar arası belirgin bulaşıklık değerleri ayrımları belirlenmemiştir. Elisa bulaşıklık değerlerinin oldukça düşük olmasının (yüksek tolerans) yanısıra bulaşıklık değerleri 0'a oldukça yakın olan genotipler (bulaşık olmayan) de belirlenmiştir.

## 5.2. RNA İzolasyonu, Miktar ve Kalite Tayini

İzole edilen RNA örneklerinin miktar ve kaliteleri, Nanodrop ND 1000 cihazı ile spektrofotometre ölçümleri (Çizelge 5.2.) ve % 1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir (Şekil 5.1.). Elde edilen jel görüntüleri ve spektrofometrik veriler Real Time PCR analizlerinde kullanılacak kadar miktar ve saflıkta RNA elde edildiğini göstermektedir.



Şekil 5.1. İzole edilen RNA'lara ait bazı RNA'ların agaroz jel (%1 ) görüntüsü

Çizelge 5.2. 35 örnek ve bir kontrole ait RNA'ların spektrofometrik ölçümleri

Örnek No	Tür ismi	ng/µl	260/280	260/230
1	<i>Beta corolliflora</i>	651,50	1,93	1,39
2	<i>Beta corolliflora</i>	497,30	1,83	1,57
3	<i>Beta corolliflora</i>	500,00	1,63	1,38
4	<i>Beta corolliflora</i>	836,25	1,66	1,50
5	<i>Beta corolliflora</i>	692,9	1,82	1,36
6	<i>Beta maritama</i>	811,50	1,77	1,80
7	<i>Beta maritama</i>	900,00	1,81	1,66
8	<i>Beta maritama</i>	890,22	1,92	1,78
9	<i>Beta maritama</i>	411,40	1,62	1,71

10	<i>Beta maritama</i>	434,00	1,83	1,62
11	<i>Beta adanensis</i>	788,23	1,83	1,82
12	<i>Beta adanensis</i>	922,63	1,65	1,76
13	<i>Beta adanensis</i>	634,50	1,84	1,88
14	<i>Beta adanensis</i>	711,32	1,73	1,76
15	<i>Beta adanensis</i>	683,64	1,82	1,88
16	<i>Beta lomatogona</i>	921,89	1,92	1,86
17	<i>Beta lomatogona</i>	778,70	1,93	1,95
18	<i>Beta lomatogona</i>	905,50	1,91	1,86
19	<i>Beta lomatogona</i>	664,80	1,81	1,95
20	<i>Beta lomatogona</i>	885,52	1,84	1,95
21	<i>Beta trigyna</i>	445,30	1,92	1,99
22	<i>Beta trigyna</i>	662,90	1,93	1,98
23	<i>Beta trigyna</i>	624,20	1,82	1,99
24	<i>Beta trigyna</i>	880,73	1,93	1,96
25	<i>Beta trigyna</i>	734,40	1,93	1,97
26	<i>Beta intermedia</i>	487,00	1,92	1,83
27	<i>Beta intermedia</i>	805,90	1,93	1,72
28	<i>Beta intermedia</i>	525,54	1,92	1,91
29	<i>Beta intermedia</i>	518,00	1,82	1,91
30	<i>Beta intermedia</i>	668,69	1,71	1,97
31	<i>Beta macrorhiza</i>	690,50	1,93	1,98
32	<i>Beta macrorhiza</i>	958,89	1,82	1,96
33	<i>Beta macrorhiza</i>	658,69	1,92	1,91
34	<i>Beta macrorhiza</i>	390,50	1,88	1,97
35	<i>Beta macrorhiza</i>	358,89	1,98	1,98
36	Kontrol	510,00	1,80	1,96

### 5.3. cDNA Sentezi

35 adet yabancı pancar genotipine ait cDNA'ların spektrofometrik ölçümleri sırası ile Çizelge 5.3.' te sunulmuştur. cDNA'ların saflıkları (260/280, 260/230) yeterli bulunurken, miktarları (ng/µl) beklenen oranlarda (yaklaşık 2000ng) elde edilmiştir.

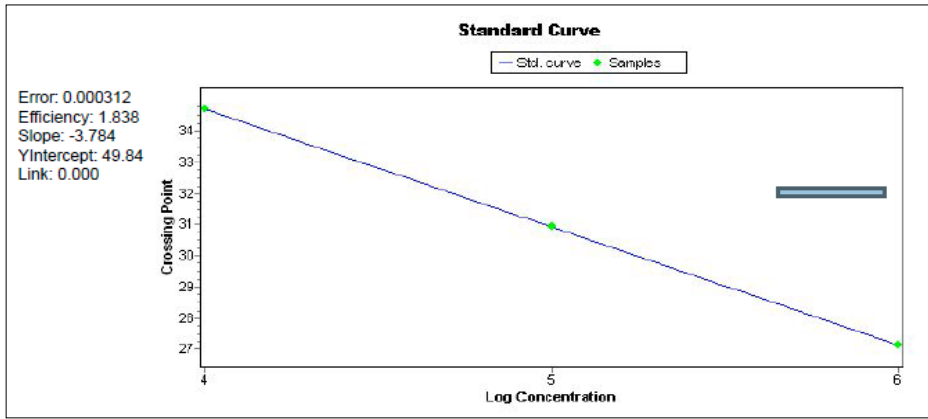
**Çizelge 5.3.** 35 adet örnek ve bir kontrole ait cDNA'ların spektrofometrik ölçümleri

Örnek No	Tür ismi	ng/µl	260/280	260/230
1	<i>Beta corolliflora</i>	1951,50	2,23	2,39
2	<i>Beta corolliflora</i>	1997,30	2,23	2,39
3	<i>Beta corolliflora</i>	1900,00	2,23	2,38
4	<i>Beta corolliflora</i>	2036,25	2,23	2,32
5	<i>Beta corolliflora</i>	2092,90	2,22	2,36
6	<i>Beta maritama</i>	1811,50	2,22	2,35
7	<i>Beta maritama</i>	1900,00	2,22	2,36
8	<i>Beta maritama</i>	1990,22	2,22	2,38

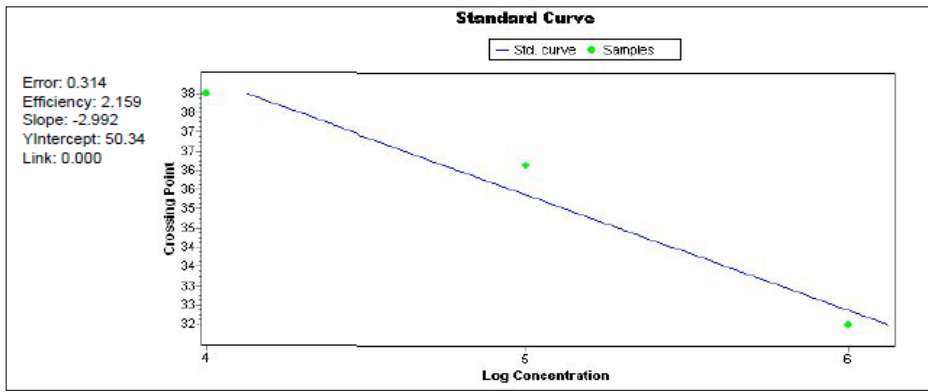
9	<i>Beta maritama</i>	2011,40	2,22	2,11
10	<i>Beta maritama</i>	2034,00	2,23	2,12
11	<i>Beta adanensis</i>	1988,23	2,23	2,12
12	<i>Beta adanensis</i>	1922,63	2,23	2,36
13	<i>Beta adanensis</i>	1934,50	2,24	2,28
14	<i>Beta adanensis</i>	1911,32	2,23	1,36
15	<i>Beta adanensis</i>	2083,64	2,22	1,28
16	<i>Beta lomatogona</i>	1921,89	2,22	2,36
17	<i>Beta lomatogona</i>	1978,70	2,23	1,35
18	<i>Beta lomatogona</i>	2005,50	2,21	2,26
19	<i>Beta lomatogona</i>	2064,80	2,21	2,25
20	<i>Beta lomatogona</i>	2085,52	2,24	2,35
21	<i>Beta trigyna</i>	2045,30	2,22	2,29
22	<i>Beta trigyna</i>	1962,90	2,23	1,98
23	<i>Beta trigyna</i>	2024,20	2,22	1,99
24	<i>Beta trigyna</i>	1980,73	2,23	2,36
25	<i>Beta trigyna</i>	1934,40	2,23	1,97
26	<i>Beta intermedia</i>	2087,00	2,22	2,33
27	<i>Beta intermedia</i>	2005,90	2,23	2,32
28	<i>Beta intermedia</i>	2025,54	2,22	2,31
29	<i>Beta intermedia</i>	2018,00	2,22	2,31
30	<i>Beta intermedia</i>	2018,69	2,21	2,27
31	<i>Beta macrorhiza</i>	1990,50	2,23	1,98
32	<i>Beta macrorhiza</i>	1958,89	2,22	2,36
33	<i>Beta macrorhiza</i>	2004,80	2,21	2,25
34	<i>Beta macrorhiza</i>	2085,50	2,20	2,35
35	<i>Beta macrorhiza</i>	2045,00	2,20	2,26
36	Kontrol	1960,00	2,23	1,90

#### 5.4. Primer/Prob Çiftlerine Ait Standart Eğrilerin Oluşturulması

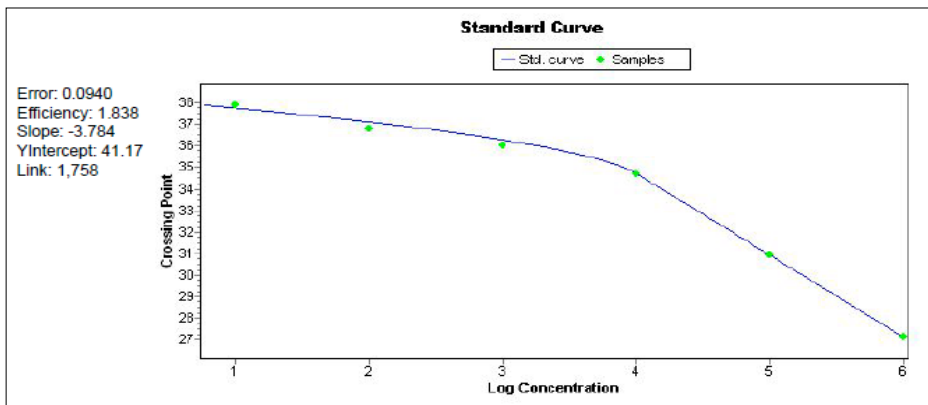
Kullanılan primer/problara ait standart eğri grafikleri Şekil 5.2., Şekil 5.3., Şekil 5.4., Şekil 5.5.' de verilmiştir. Çizilen standart eğri grafiklerinin etkinlik (efficiency) değerleri yaklaşık 2 ve slope değerleri ise -3.3'e yakın bulunmuştur. İlgili primerler için Real Time PCR reaksiyon koşullarının ve standart eğrilerin uygun olduğu belirlenmiştir.



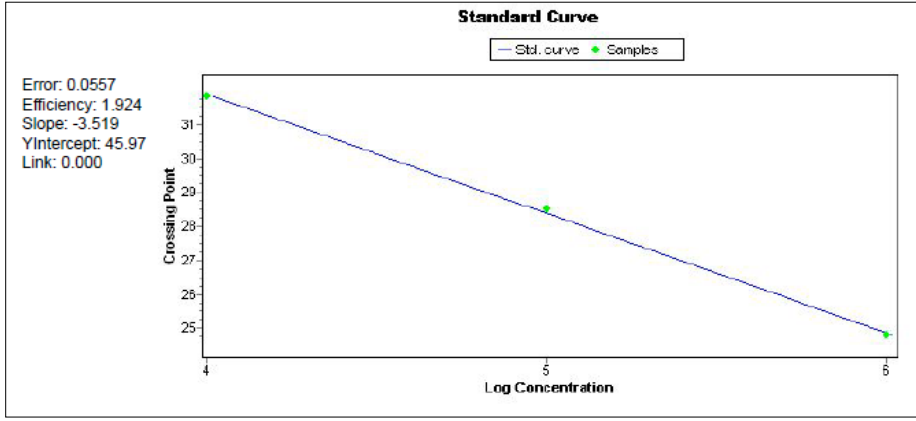
**Şekil 5.2.** Real Time PCR cihazından alınan RNA1 primerine ait standart eğri grafiği efficiency ve slope değerleri



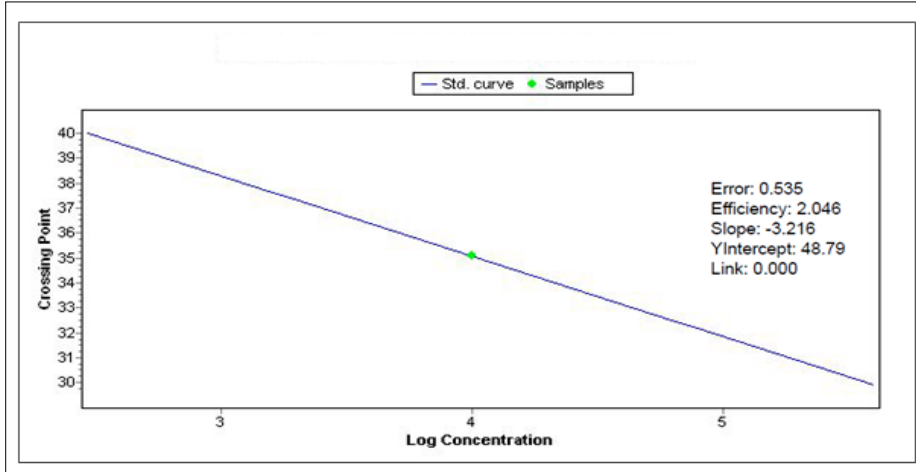
**Şekil 5.3.** Real Time PCR cihazından alınan RNA2 primerine ait standart eğri grafiği efficiency ve slope değerleri



**Şekil 5.4.** Real Time PCR cihazından alınan RNA3 primerine ait standart eğri grafiği efficiency ve slope değerleri



Şekil 5.5. Real Time PCR cihazından alınan RNA4 primerine ait standart eğri grafiği efficiency ve slope değerleri

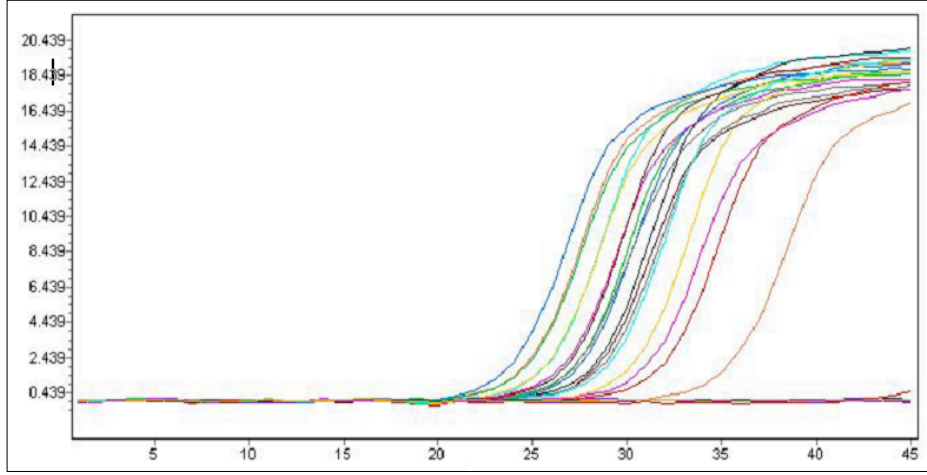


Şekil 5.6. Real Time PCR cihazından alınan *Glutamin sentetaz* genine ait standart eğri grafiği efficiency ve slope değerleri

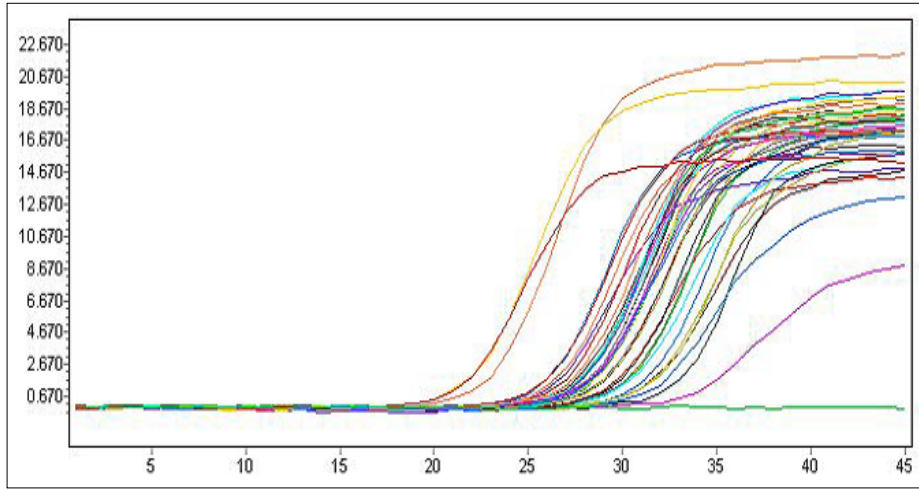
## 5.5. İfade Analizleri

### 5.5.1. Gerçek Zamanlı Amplifikasyon Eğrileri

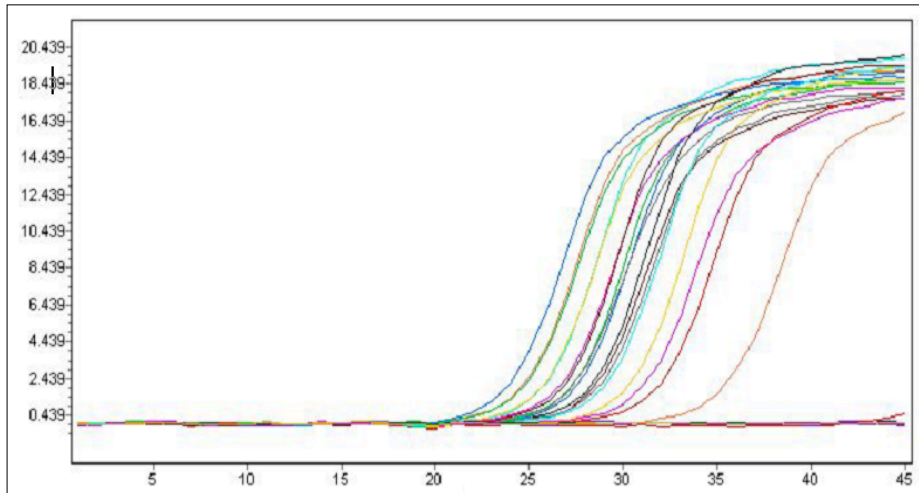
*Glutamin sentetaz*, RNA1, RNA2, RNA3, RNA4 primerinde standart ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri Şekil 5.7., Şekil 5.8., Şekil 5.9., Şekil 5.10., Şekil 5.11'de sunulmuştur. Amplifikasyon eğrilerinde Ct değerleri house keeping gen için 20-35. döngüler arasında iken bu değer RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 virüs genleri için tolerant yabancı genotiplerde 39. döngüye kadar ulaşmıştır. Kontrol örneğinde virüs genleri açısından Ct değeri elde edilmemiştir (bulaşıklık yoktur). Örneklere ait Ct değerleri Ek 1'de sunulmuştur.



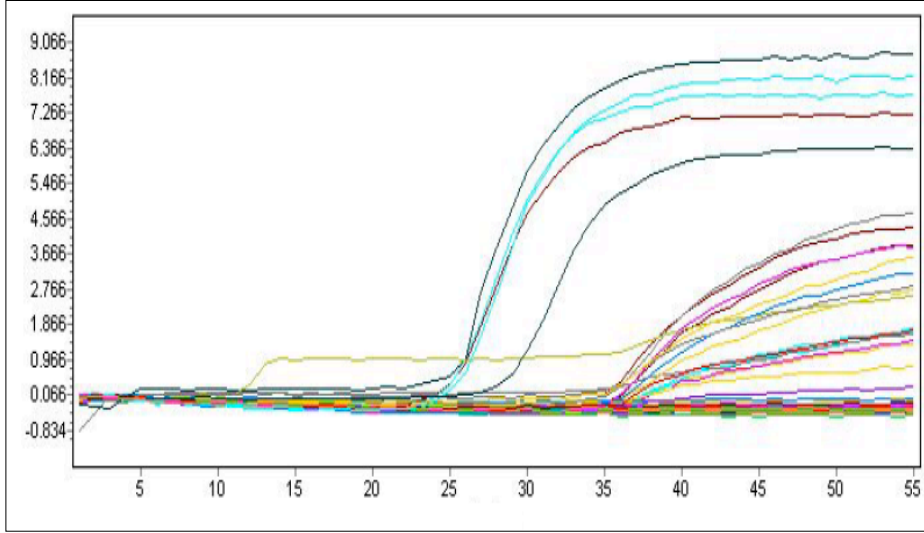
Şekil 5.7. RNA1 primerinde kontrol ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri



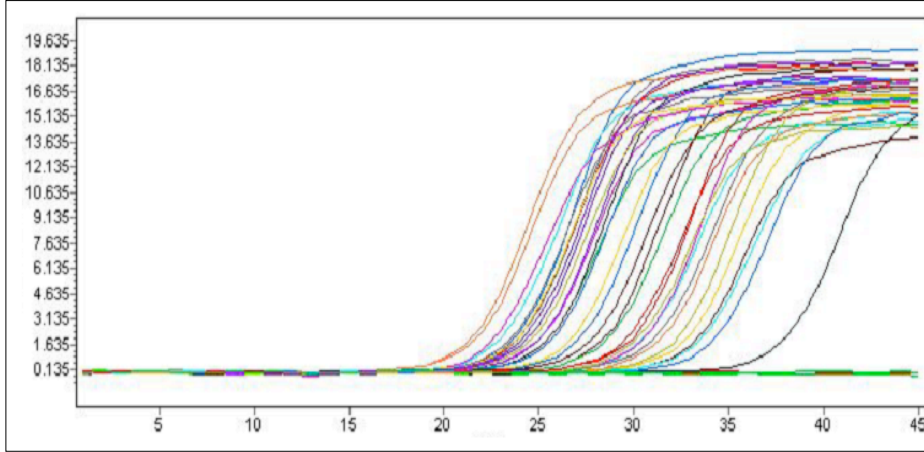
Şekil 5.8. RNA2 primerinde kontrol ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri



Şekil 5.9. RNA3 primerinde kontrol ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri



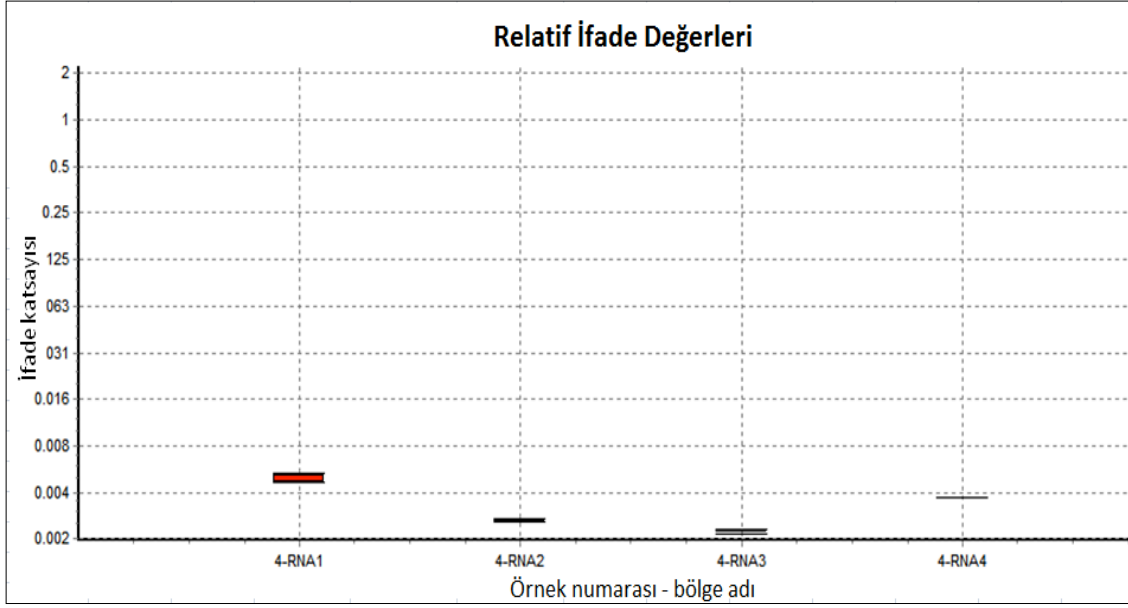
Şekil 5.10. RNA4 primerinde kontrol ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri



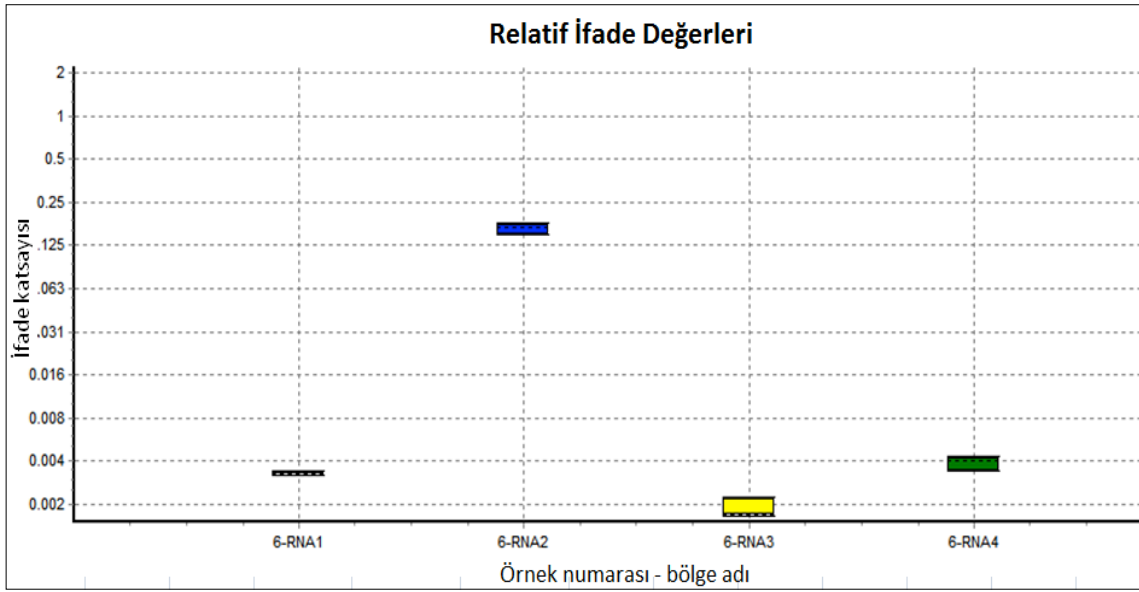
Şekil 5.11. *Glutamin sentetaz* geninde kontrol ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri

### 5.5.2. Real Time PCR Verilerinin İfade Analizleri

35 yabancı şeker pancarı genotipinde, 'Glutamin sentetaz' house keeping genine göre BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifade analizleri yapılmış olup Şekil 5.12.a., Şekil 5.12.b., Şekil 5.12.c., Şekil 5.12.d., Şekil 5.12.e., Şekil 5.13.a., Şekil 5.13.b., Şekil 5.13.c., Şekil 5.13.d., Şekil 5.13.e., Şekil 5.14.a., Şekil 5.14.b., Şekil 5.14.c., Şekil 5.14.d., Şekil 5.14.e., Şekil 5.15.a., Şekil 5.15.b., Şekil 5.15.c., Şekil 5.15.d., Şekil 5.15.e., Şekil 5.16.a., Şekil 5.16.b., Şekil 5.16.c., Şekil 5.16.d., Şekil 5.16.e., Şekil 5.17.a., Şekil 5.17.b., Şekil 5.17.c., Şekil 5.17.d., Şekil 5.17.e., Şekil 5.18.a., Şekil 5.18.b., Şekil 5.18.c., Şekil 5.18.d., Şekil 5.18.e.,'de sunulmuştur.

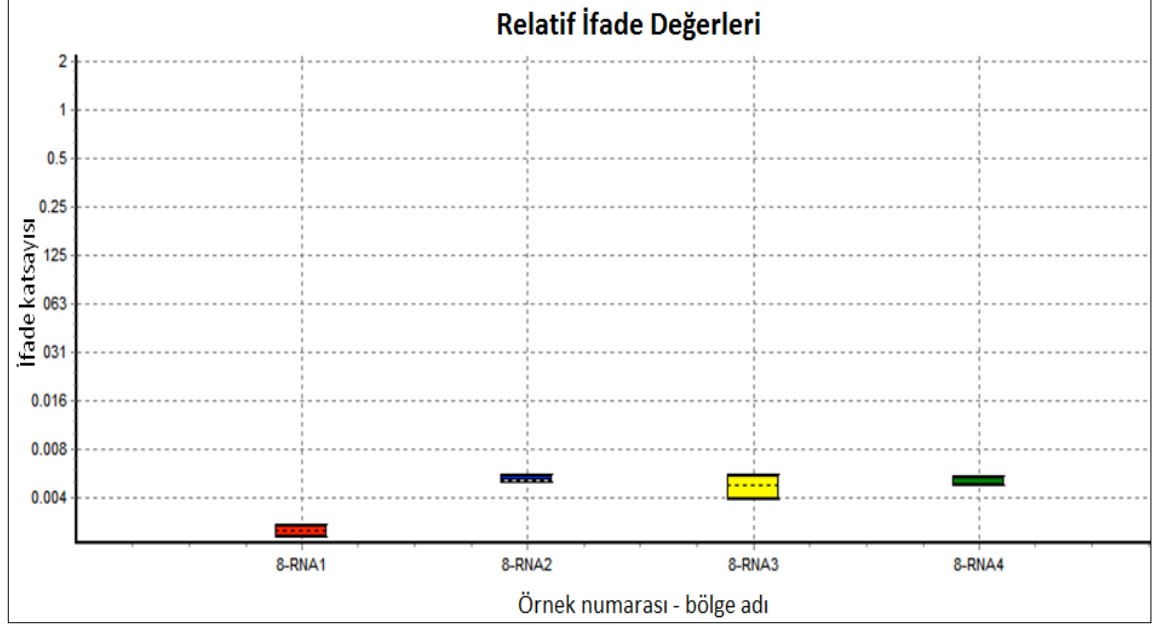


Şekil 5.12.a. 4 gen bankası numarasına sahip *Beta maritima* (Antalya) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi

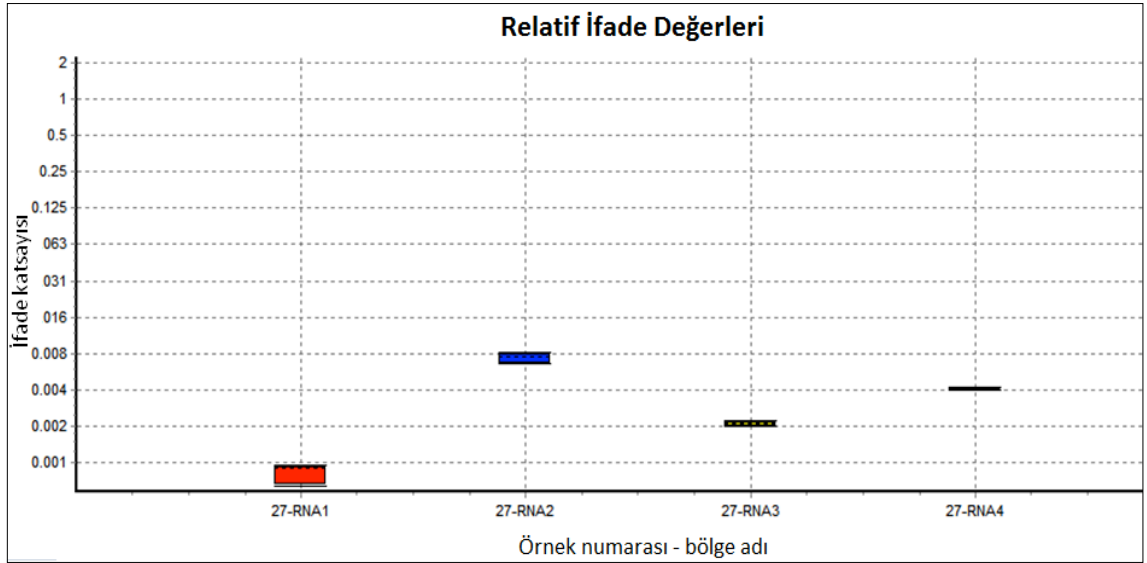


Şekil 5.12.b. 6 gen bankası numarasına sahip *Beta maritima* (Adana) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi

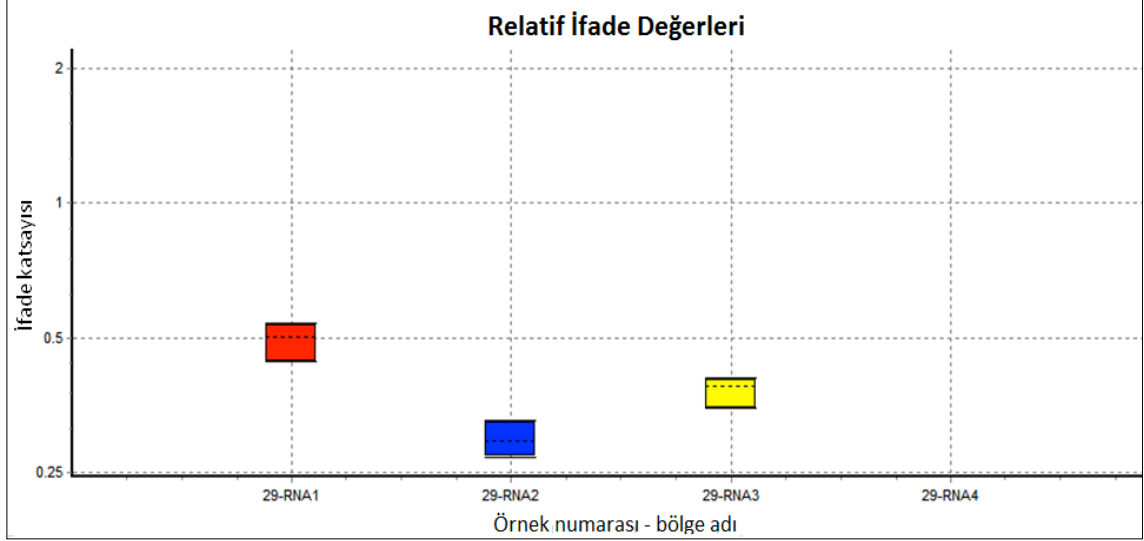




Şekil 5.12.c. 8 gen bankası numarasına sahip *Beta maritima* (Trabzon) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi

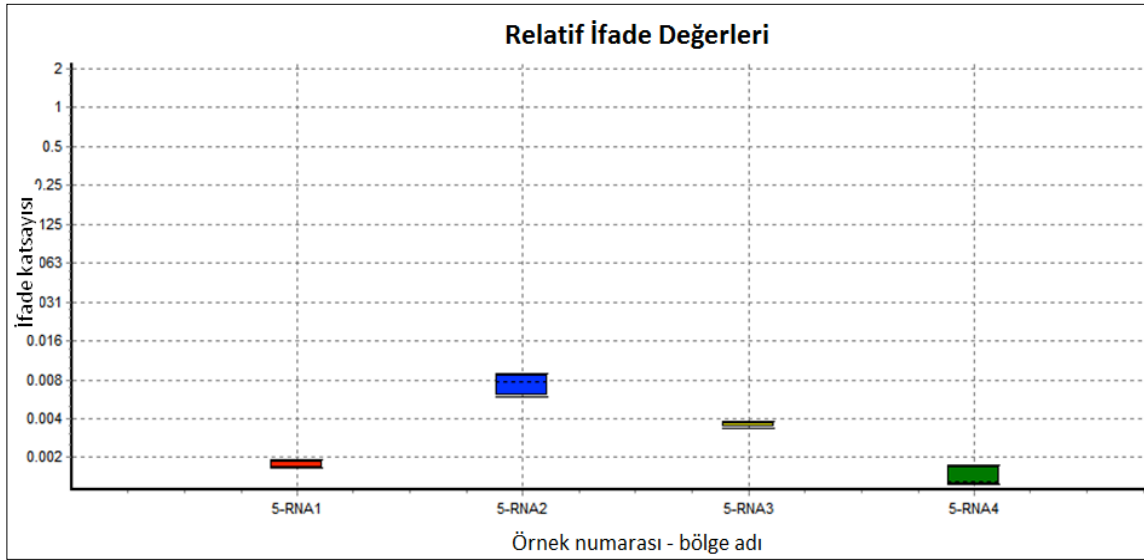


Şekil 5.12.d. 27 gen bankası numarasına sahip *Beta maritima* (İzmir) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi

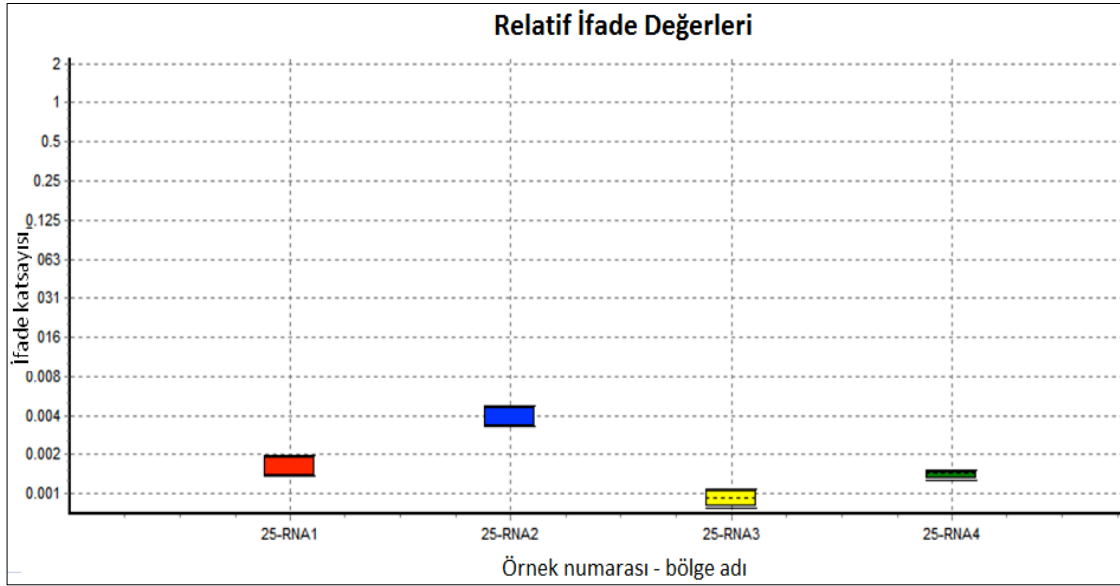


**Şekil 5.12.e.** 29 gen bankası numarasına sahip *Beta maritima* (İzmir) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi

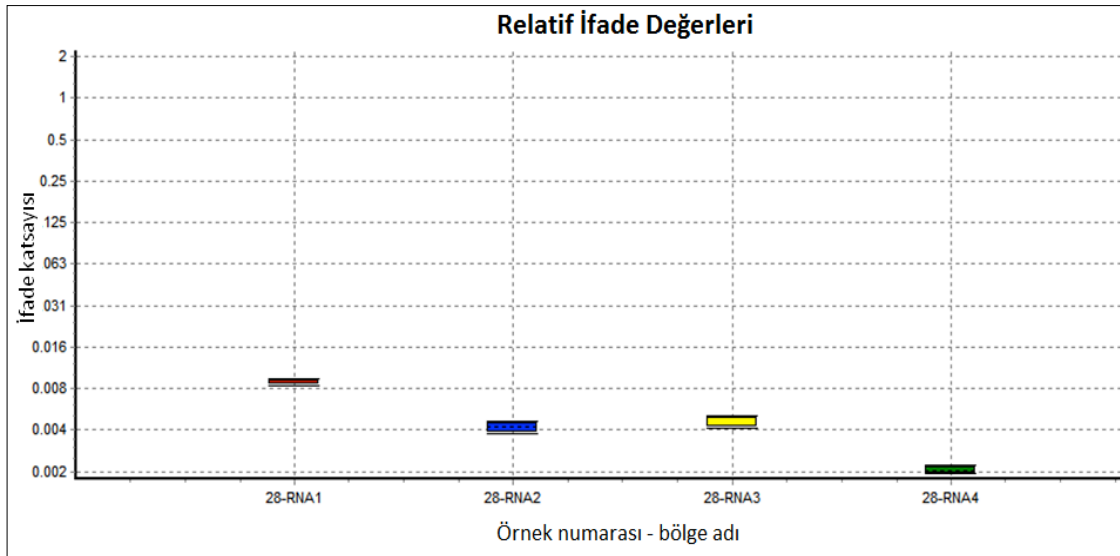
*Beta maritima*' ya ait genotiplerin analizlerinde; BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgelerine ait ifade genel olarak oldukça düşük bulunurken, özellikle 29 numaralı *Beta maritima* (İzmir) genotipinde diğer genotiplerden daha farklı ve daha fazla virüs bölgesi ifadesi belirlenmiştir.



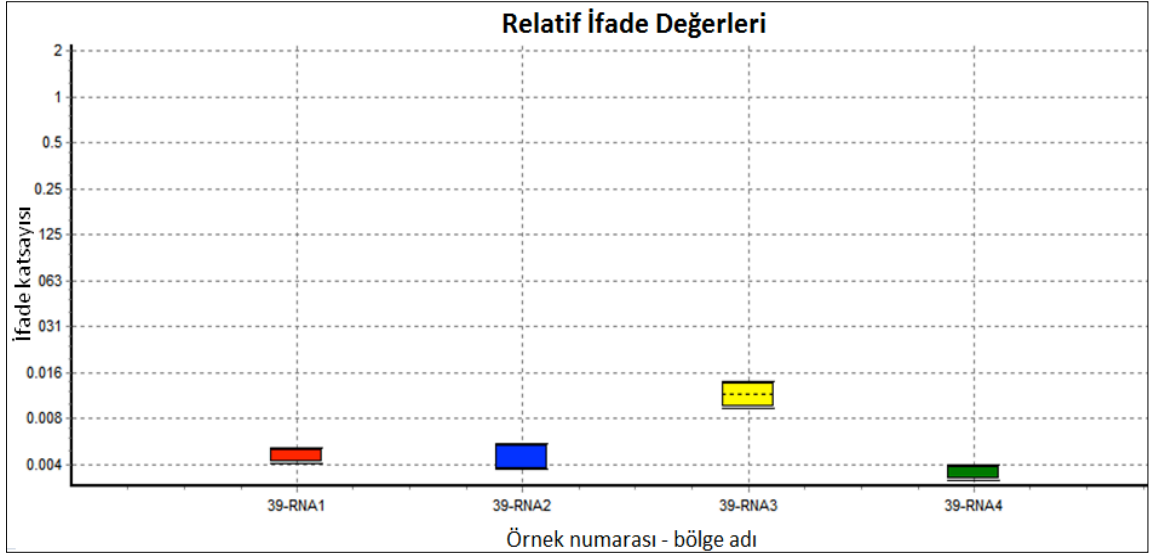
**Şekil 5.13.a.** 5 gen bankası numarasına sahip *Beta adanensis* (Adana) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi



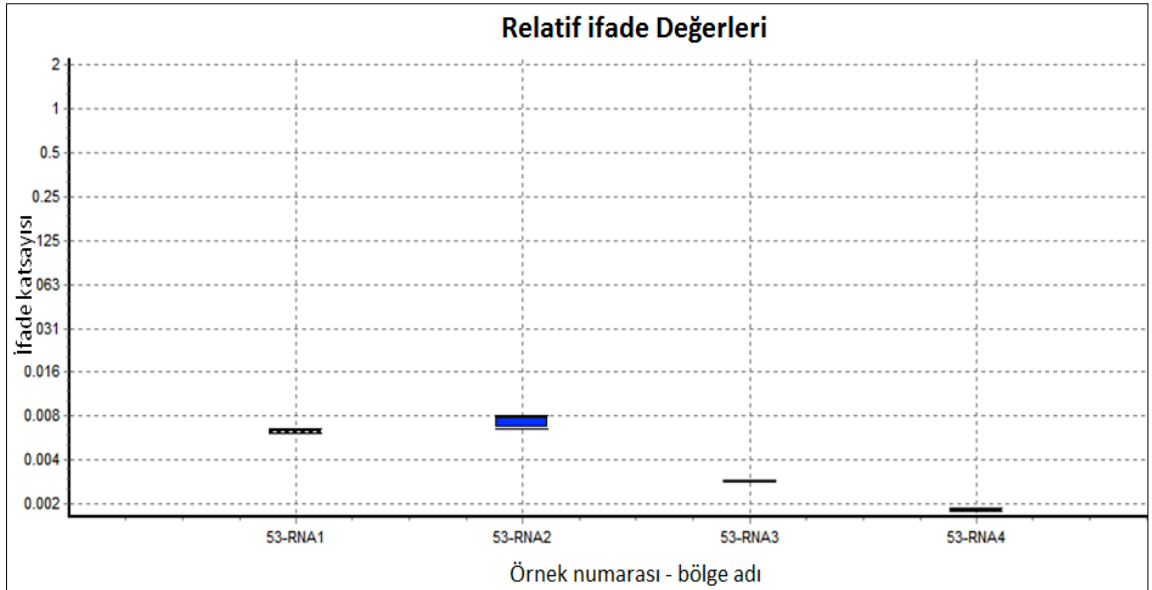
Şekil 5.13.b. 25 gen bankası numarasına sahip *Beta adanensis* (Adana) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi



Şekil 5.13.c. 28 gen bankası numarasına sahip *Beta adanensis* (Adana) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi

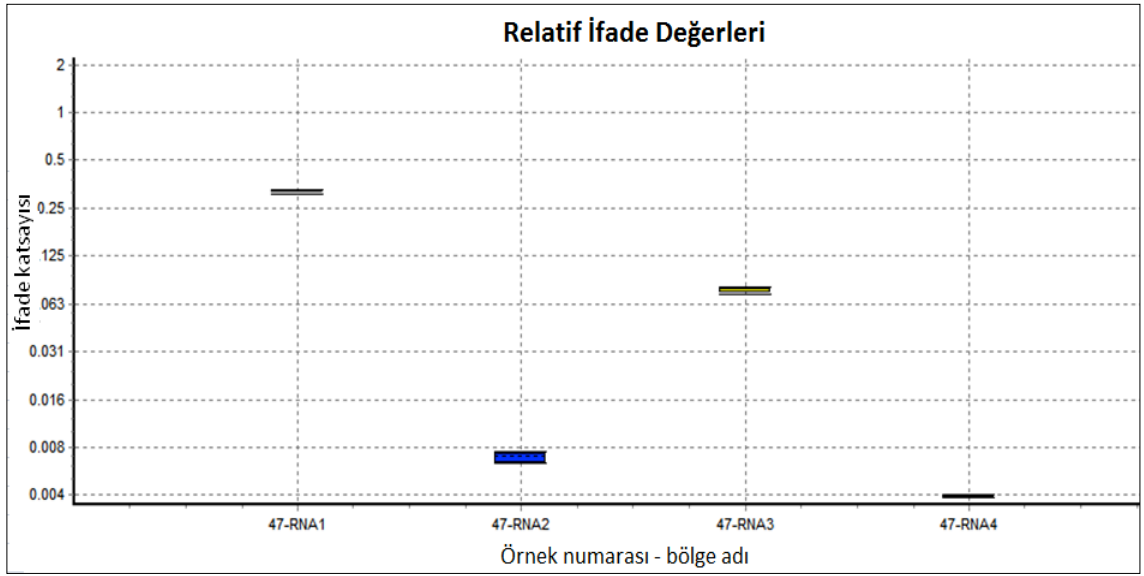


**Şekil 5.13.d.** 39 gen bankası numarasına sahip *Beta adanensis* (Çanakkale) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi

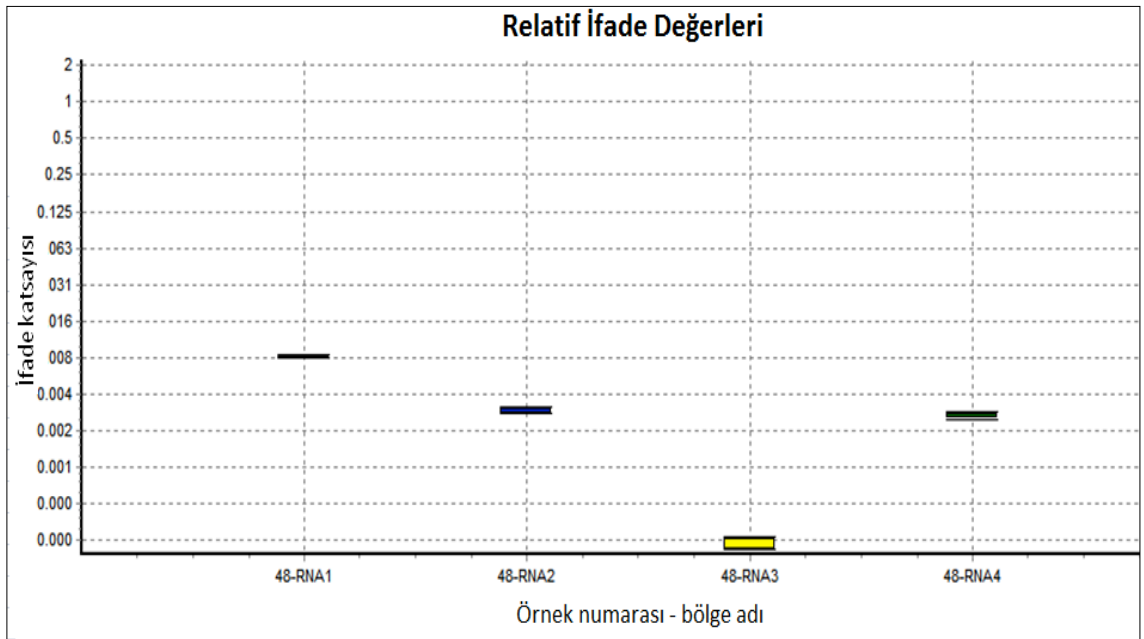


**Şekil 5.13.e.** 53 gen bankası numarasına sahip *Beta adanensis* (Adana) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi

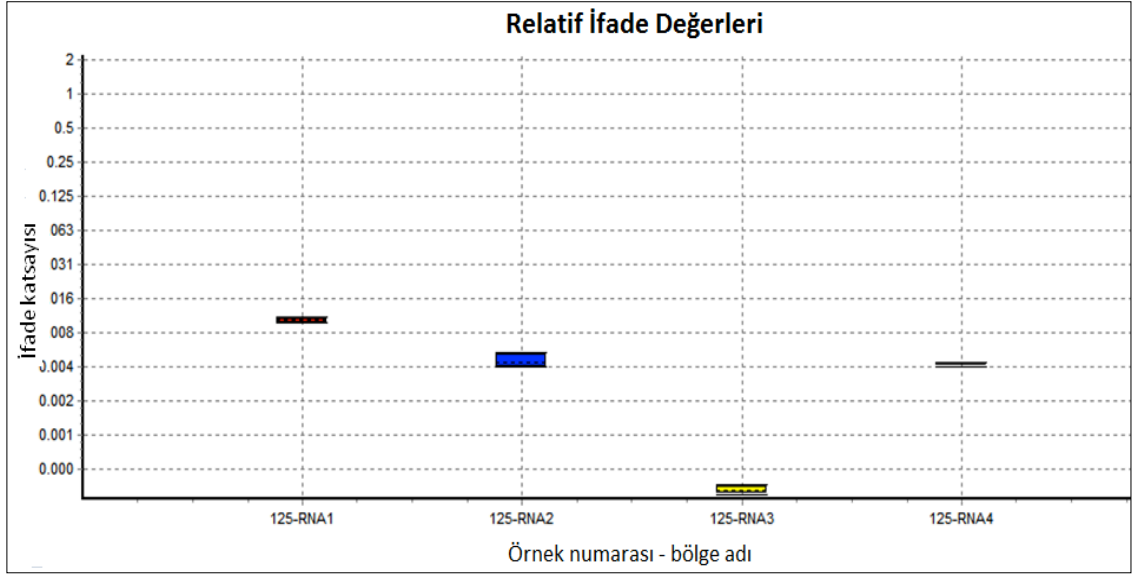
*Beta adanensis* genotiplerinde de; benzer olarak oldukça düşük BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 ifadesi belirlenmiştir. Yapılan analizlerde genotiplerde, özellikle RNA2 ve RNA4' nin ifadelerinin oldukça stabil olduğu belirlenmiştir.



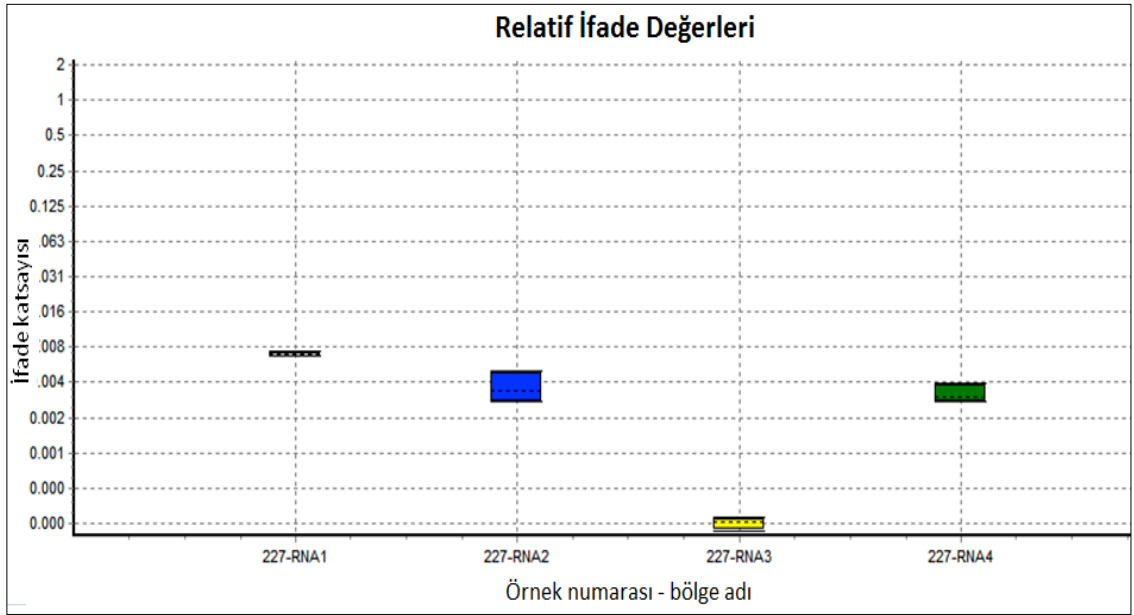
**Şekil 5.14.a.** 47 gen bankası numarasına sahip *Beta trigyna* (Bolu) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi



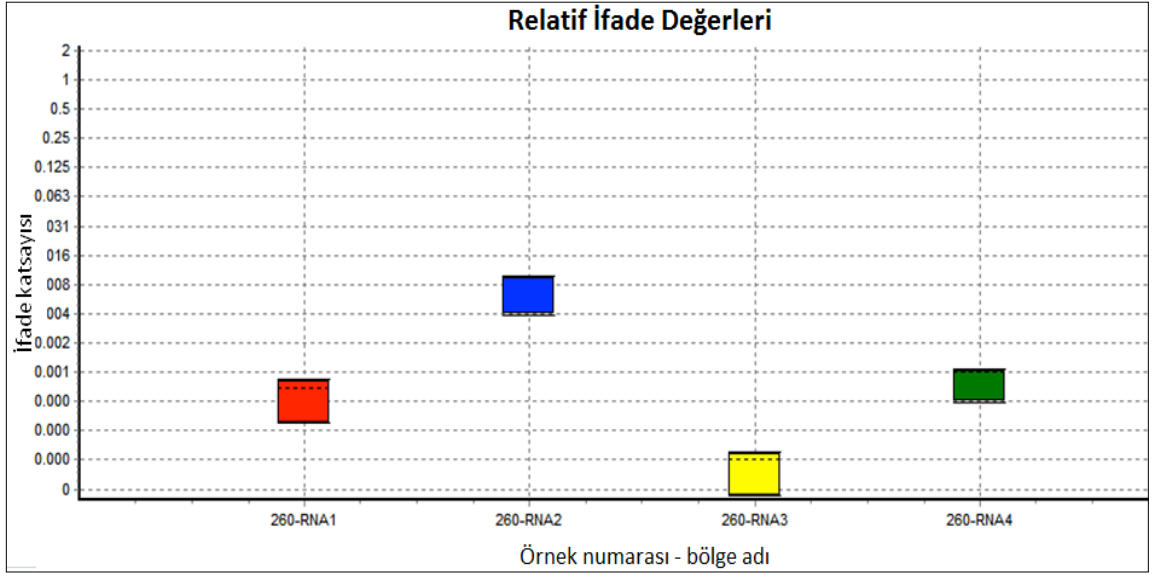
**Şekil 5.14.b.** 48 gen bankası numarasına sahip *Beta trigyna* (Kütahya) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi



Şekil 5.14.c. 125 gen bankası numarasına sahip *Beta trigyna* (Eskişehir) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi

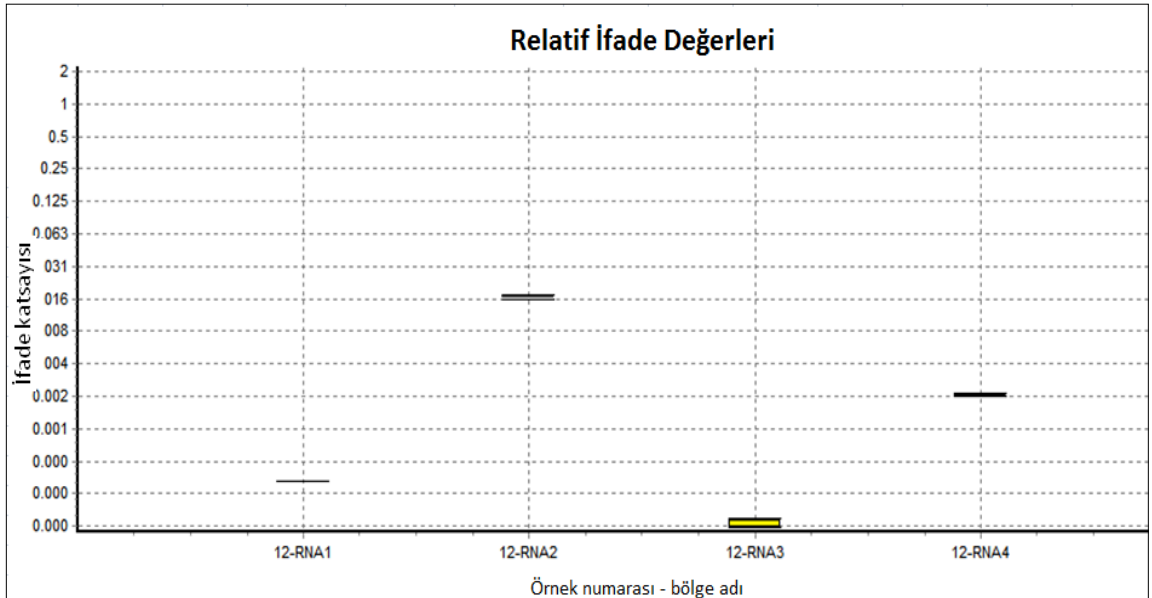


Şekil 5.14.d. 227 gen bankası numarasına sahip *Beta trigyna* (Bilecik) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi

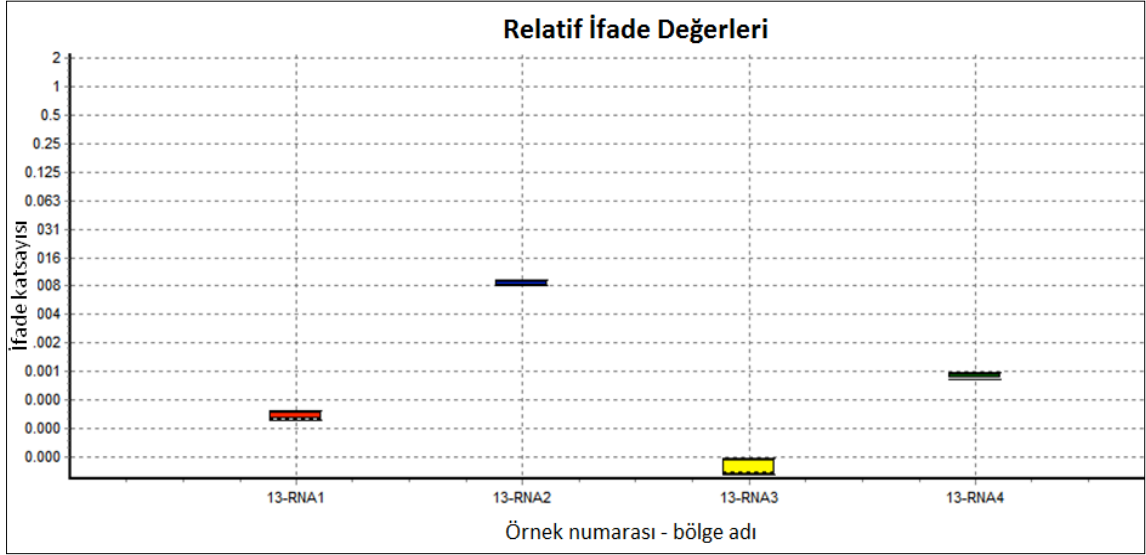


**Şekil 5.14.e.** 260 gen bankası numarasına sahip *Beta trigyna* (Erzurum) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi

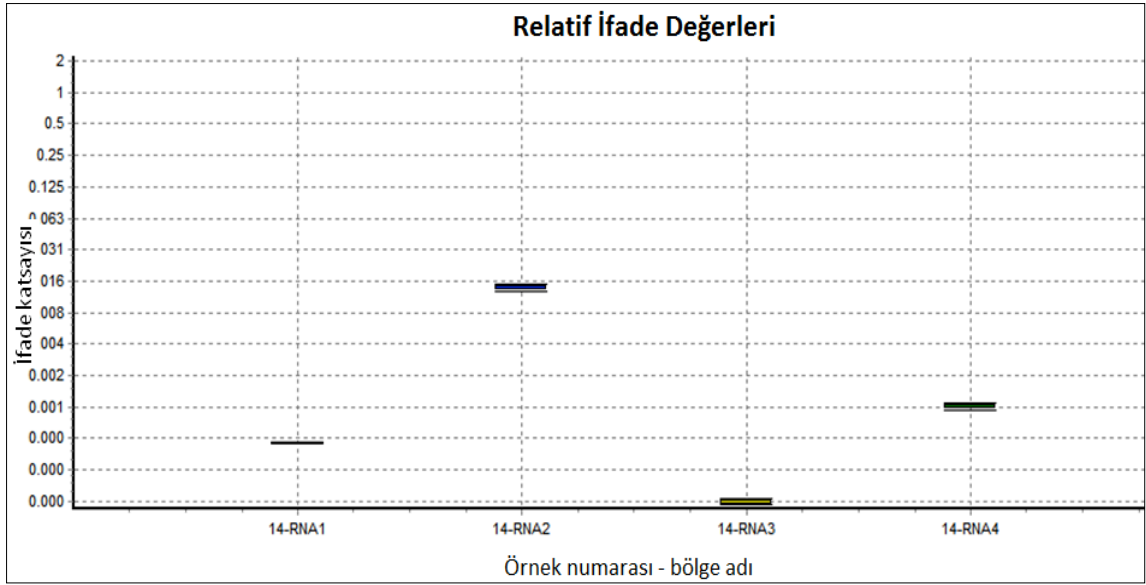
*Beta trigyna*' ya ait genotiplerin ifade analizlerinde benzer düşük virüs bölgesi ifadesi belirlenmiştir. 260 gen bankası numaralı *Beta trigyna* (Erzurum) genotipi dışındaki diğer genotiplerde en yüksek ifade RNA1 virüs bölgesinde belirlenmiştir. *Beta trigyna*/ Erzurum genotipinde ise en yüksek ifade RNA2 bölgesi için belirlenmiştir.



**Şekil 5.15.a.** 12 gen bankası numarasına sahip *Beta lomatogona* (Erzurum) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi

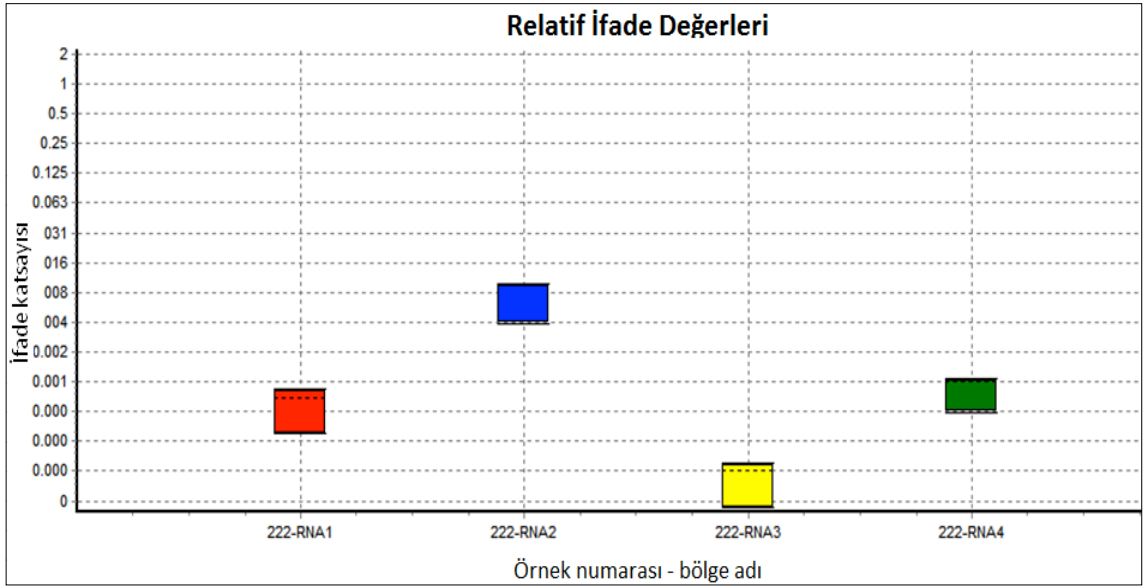


Şekil 5.15.b. 13 gen bankası numarasına sahip *Beta lomatogona* (Erzurum) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi

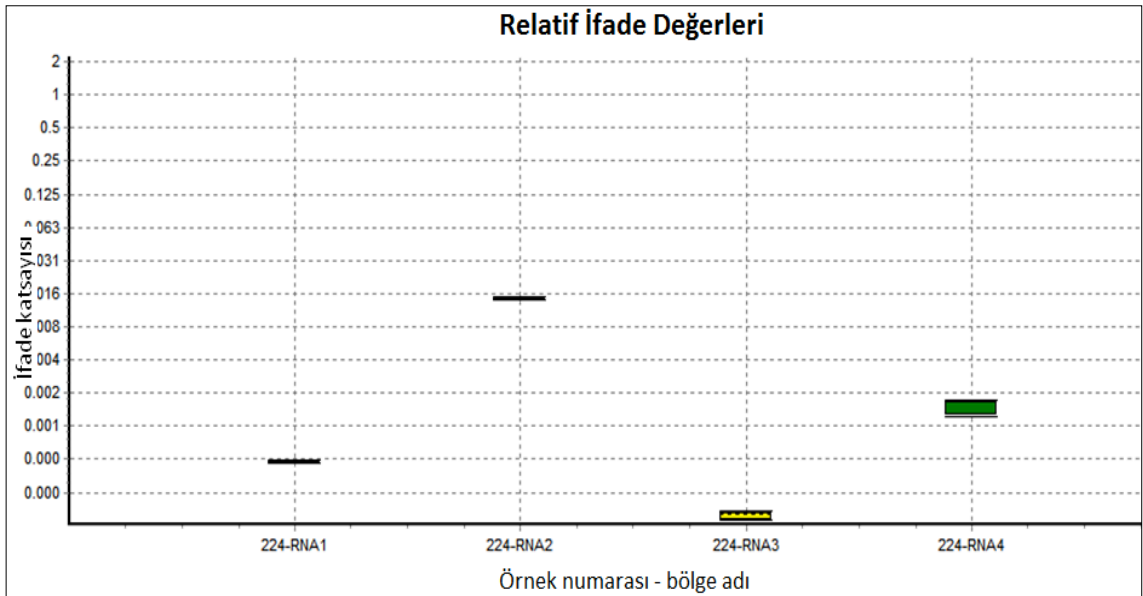


Şekil 5.15.c. 14 gen bankası numarasına sahip *Beta lomatogona* (Erzurum) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi



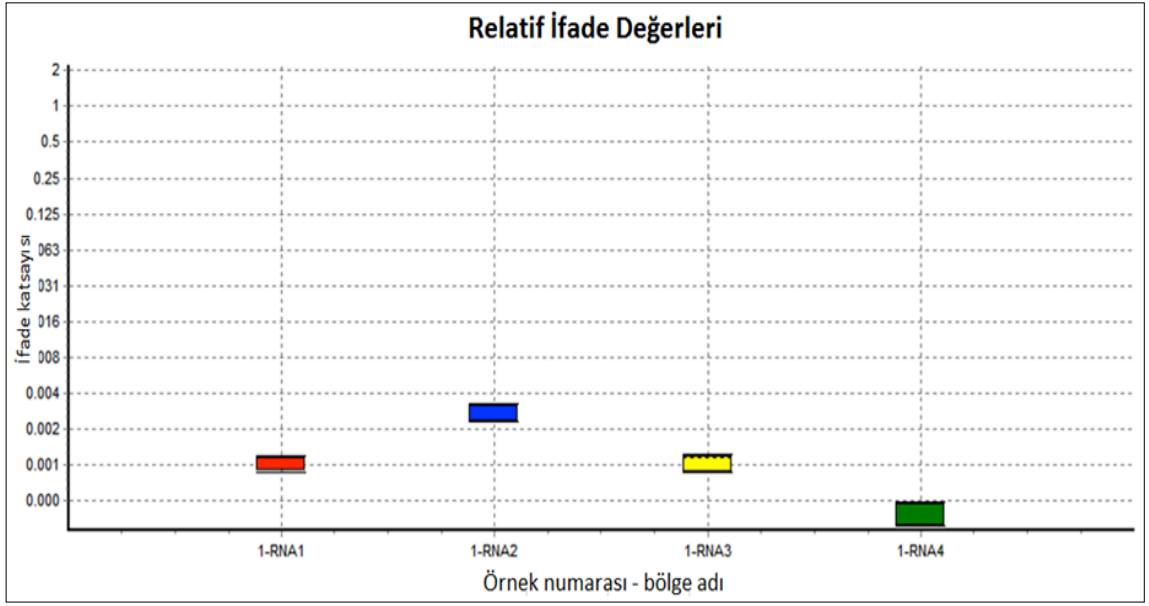


Şekil 5.15.d. 222 gen bankası numarasına sahip *Beta lomatogona* (Isparta) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi

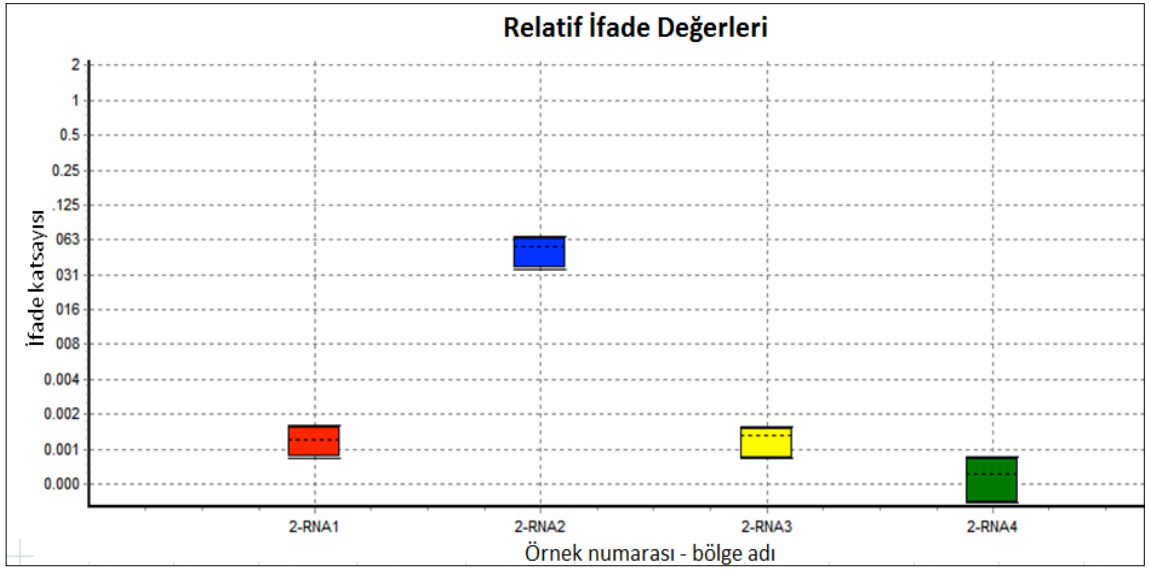


Şekil 5.15.e. 224 gen bankası numarasına sahip *Beta lomatogona* (Isparta) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi

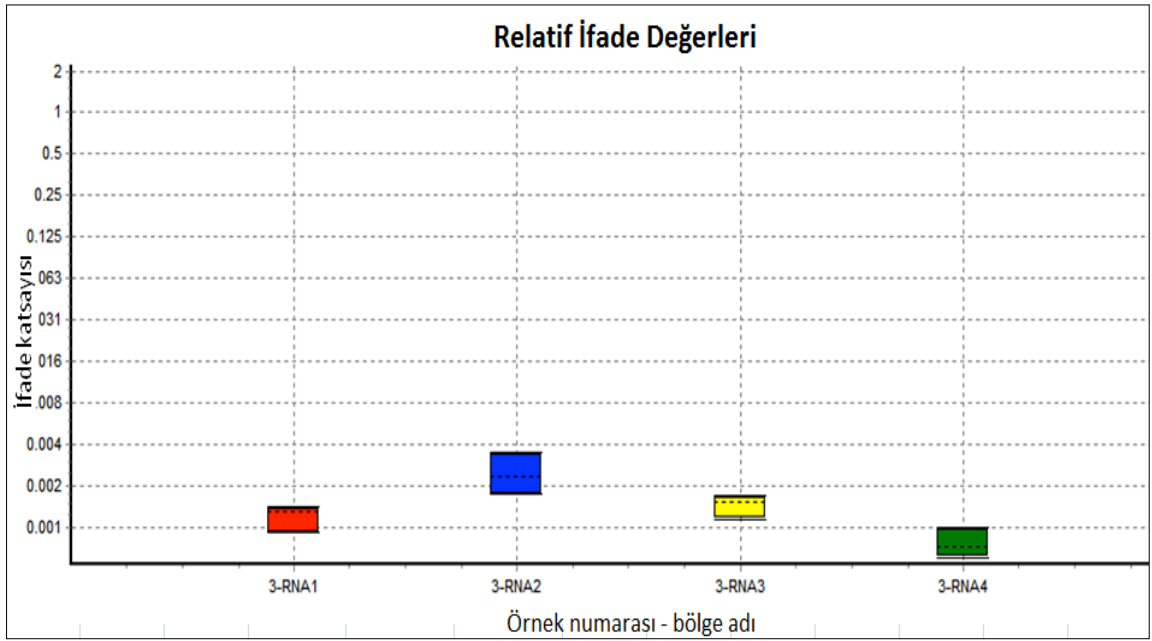
*Beta lomatogona* genotiplerindeki BNYVV RNA bölgeleri ifadesi de oldukça düşük olup incelenen tüm genotiplerde benzerdir. Bu genotiplerde özellikle RNA2 ve RNA4 bölgesi ifadesi stabil olarak yüksek bulunmuştur.



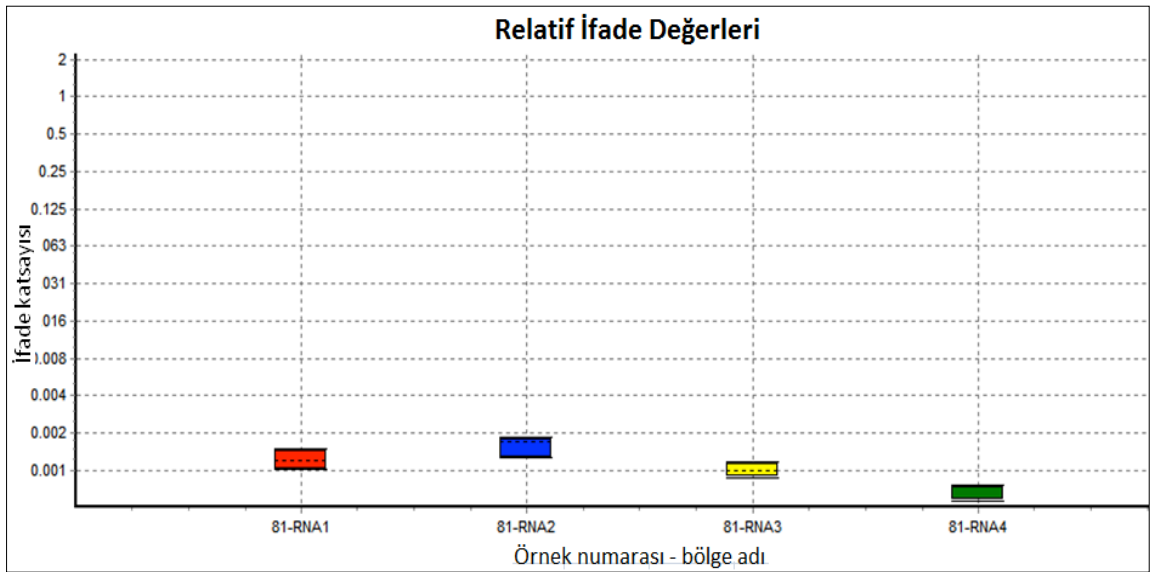
Şekil 5.16.a. 1 gen bankası numarasına sahip *Beta corolliflora* (Erzurum) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi



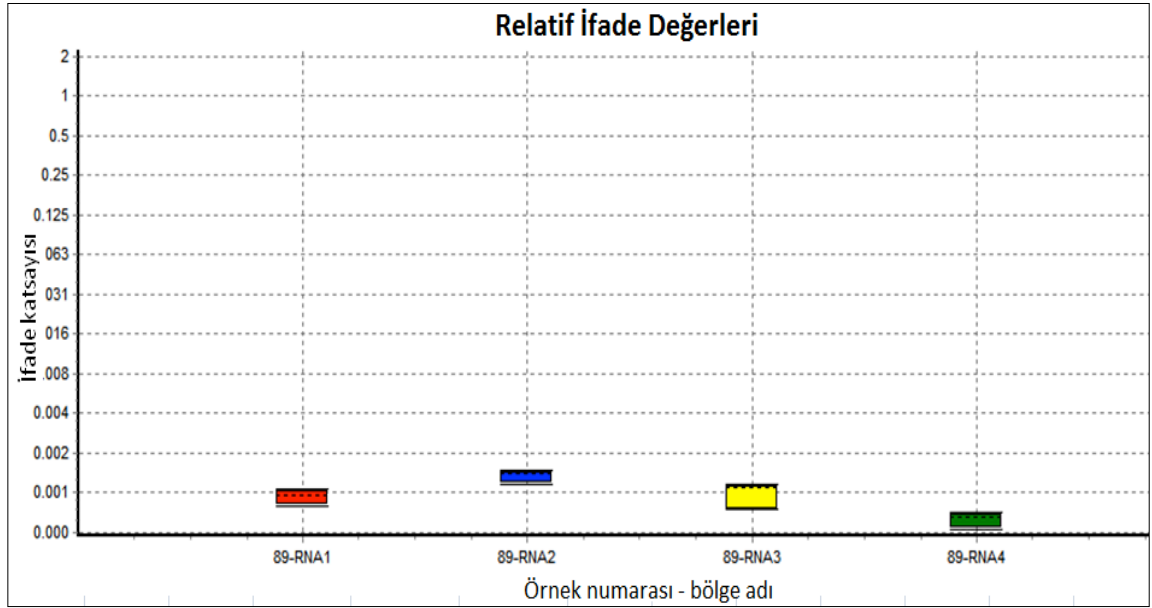
Şekil 5.16.b. 2 gen bankası numarasına sahip *Beta corolliflora* (Kars) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi



Şekil 5.16.c. 3 gen bankası numarasına sahip *Beta corolliflora* (Ağrı) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi

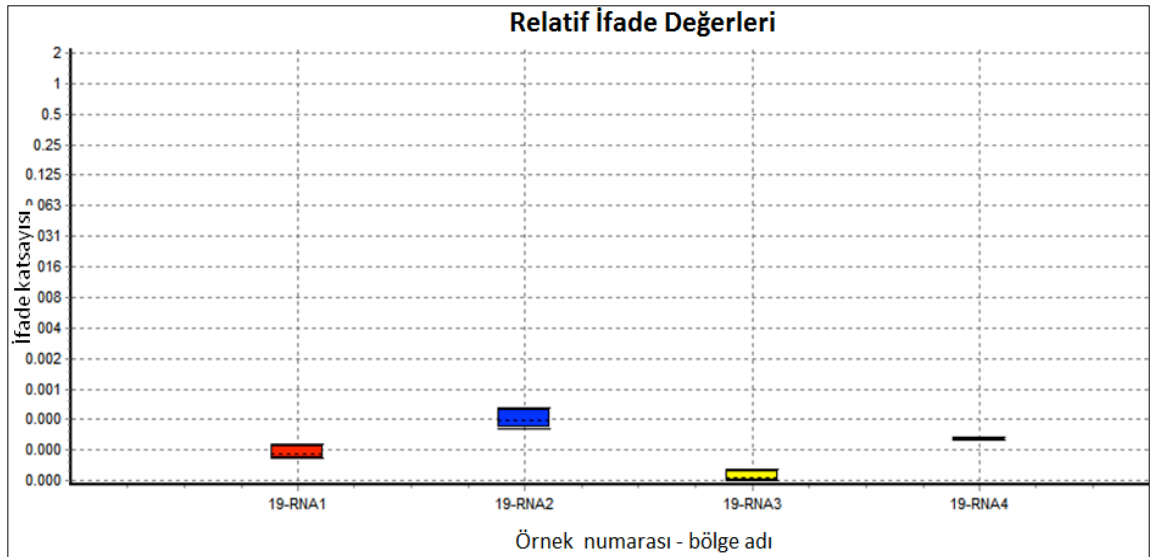


Şekil 5.16.d. 81 gen bankası numarasına sahip *Beta corolliflora* (Bilecik) genotiplerinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi

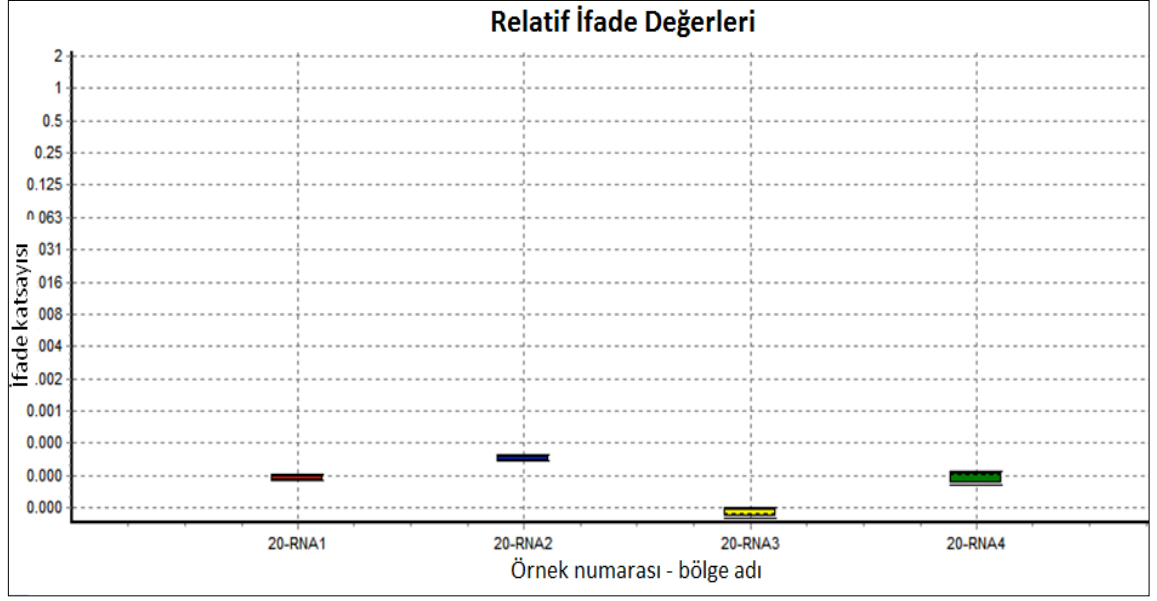


**Şekil 5.16.e.** 89 gen bankası numarasına sahip *Beta corolliflora* (Bilecik) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi

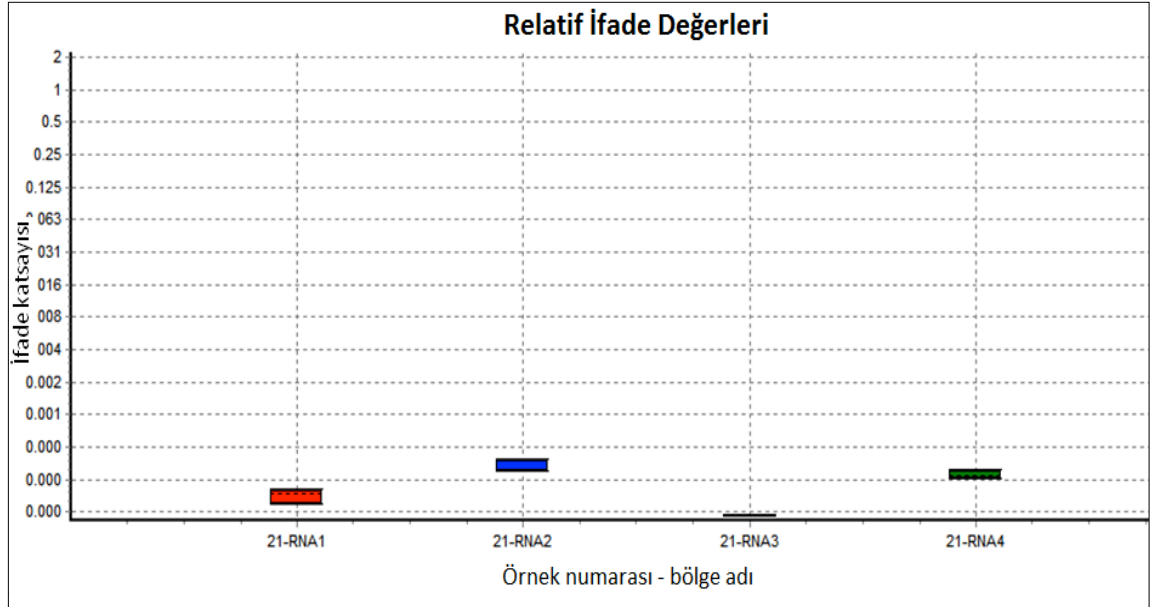
*Beta corolliflora* genotiplerine ait BNYVV RNA bölgeleri ifade analizlerinde oldukça düşük (0'a yakın) ifade belirlenmiştir. İncelenen tüm genotiplerde tüm RNA bölgelerine ait ifadeler çok düşükken en yüksek ifade RNA2 bölgesi, en düşük ifade de RNA4 bölgesi için belirlenmiştir.



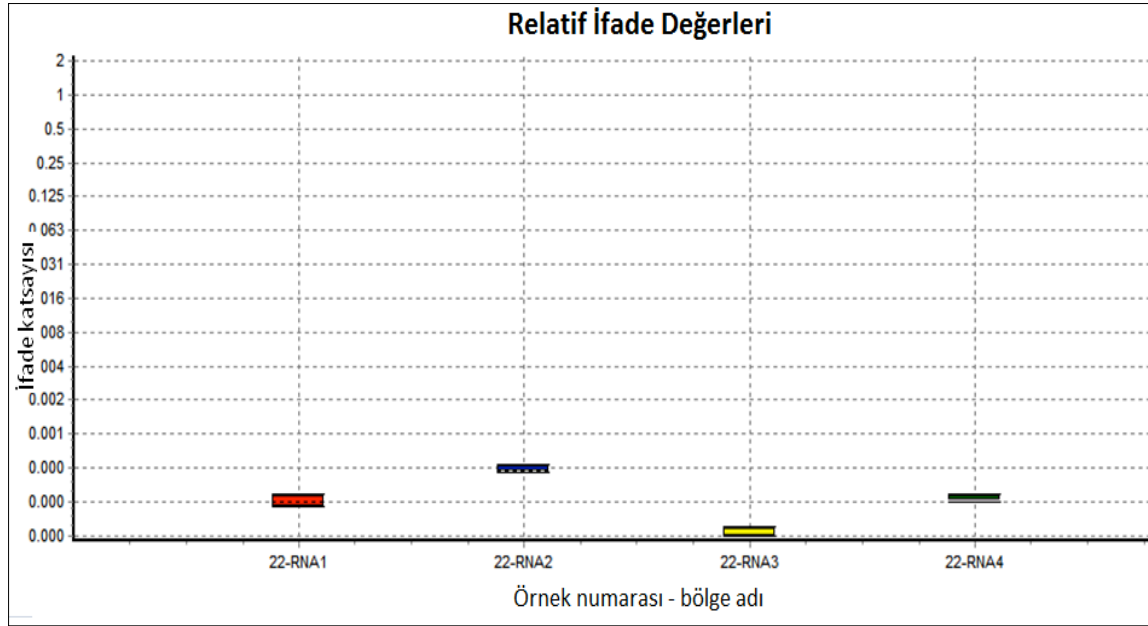
**Şekil 5.17.a.** 19 gen bankası numarasına sahip *Beta intermedia* (Eskişehir) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi



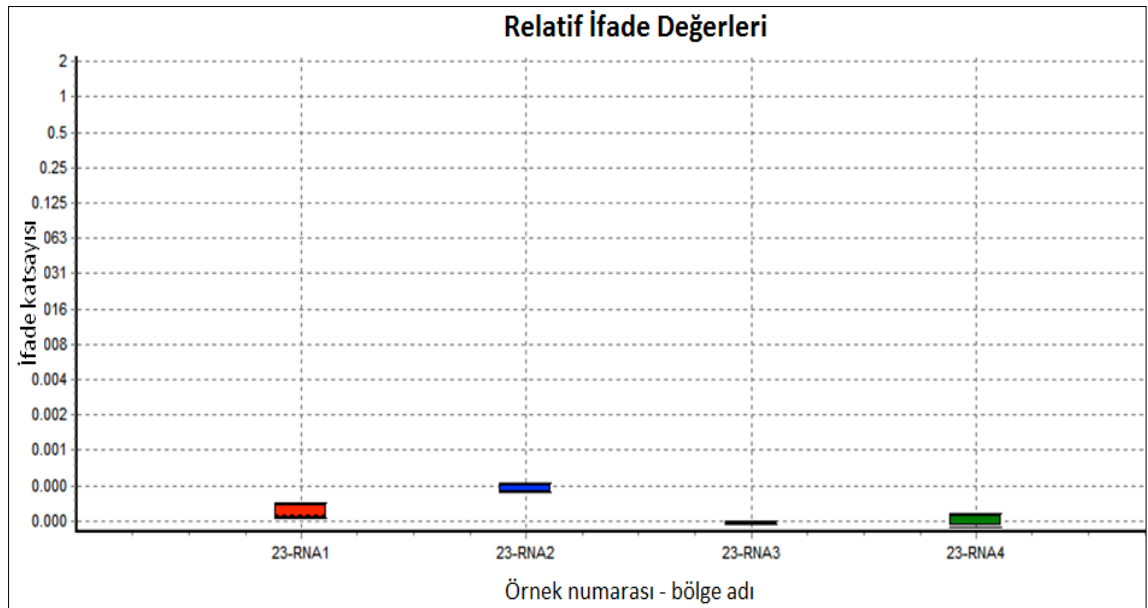
Şekil 5.17.b. 20 gen bankası numarasına sahip *Beta intermedia* (Eskişehir) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi



Şekil 5.17.c. 21 gen bankası numarasına sahip *Beta intermedia* (Eskişehir) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi

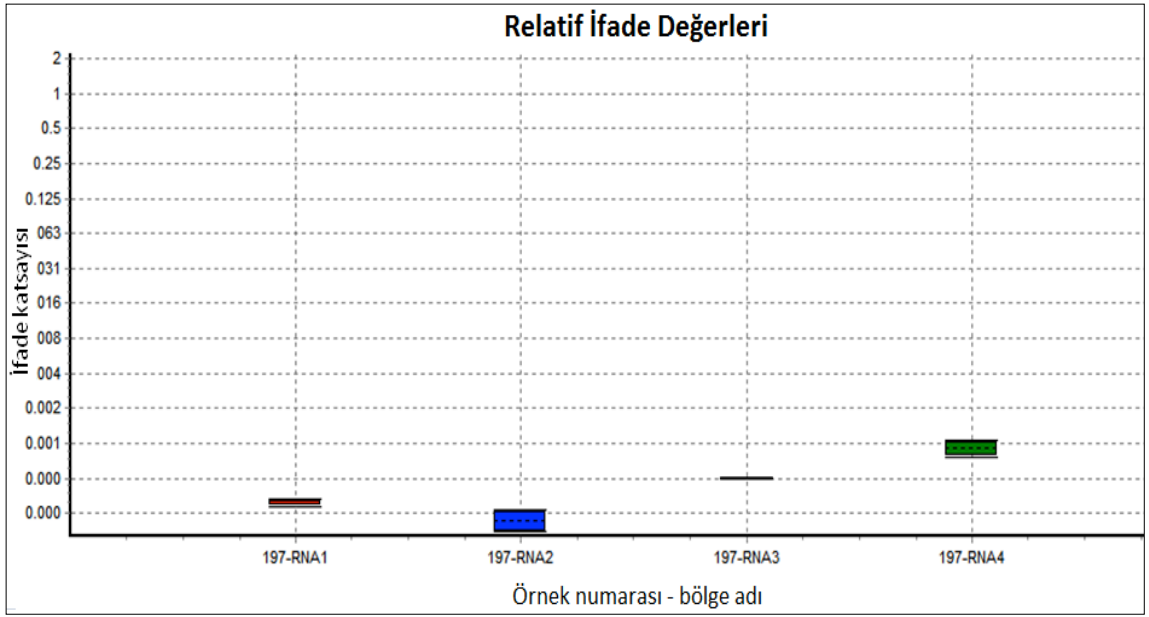


Şekil 5.17.d. 22 gen bankası numarasına sahip *Beta intermedia* (Eskişehir) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi

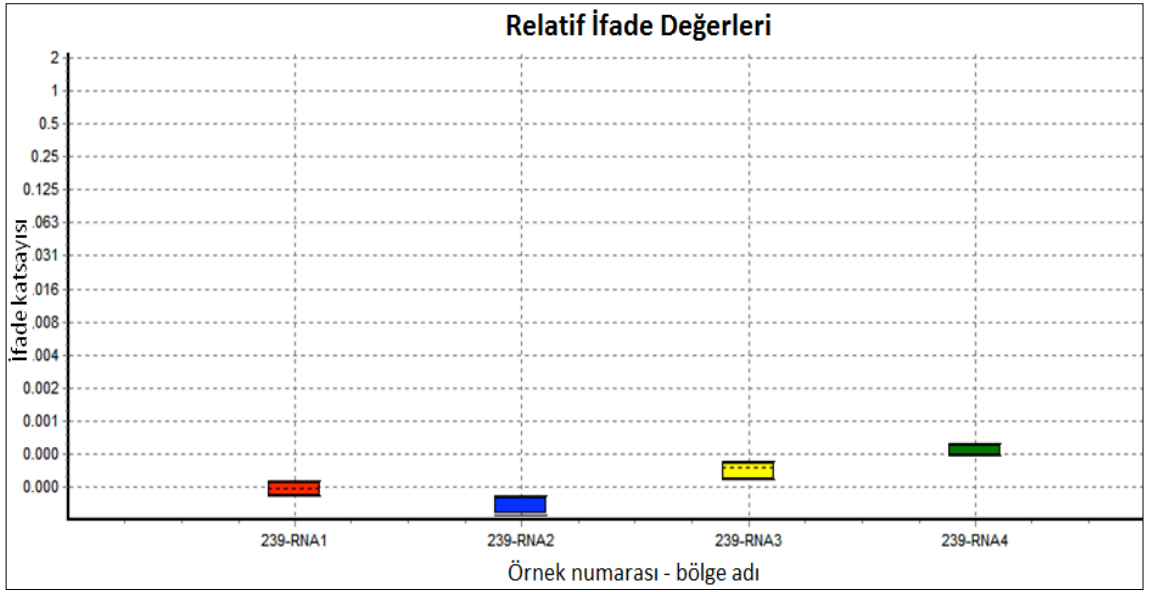


Şekil 5.17.e. 23 gen bankası numarasına sahip *Beta intermedia* (Eskişehir) genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi

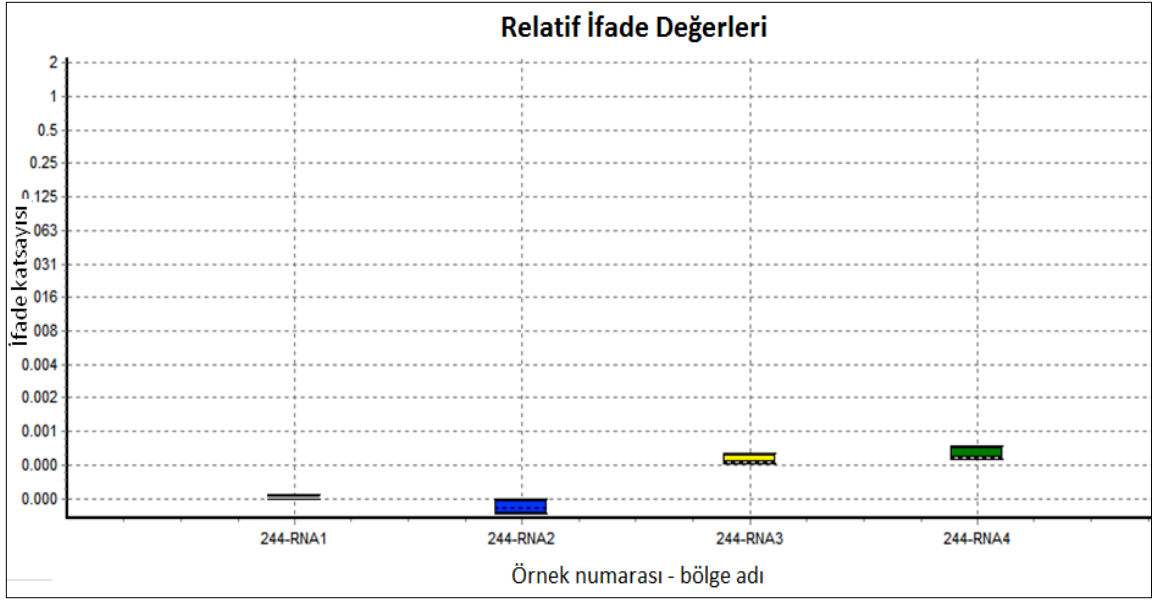
*Beta intermedia* genotiplerine ait örneklerde BNYVV RNA bölgeleri ifadesinin oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Tüm genotiplerde benzer RNA bölgeleri ifadesi belirlenirken, en yüksek ifade RNA2 ve RNA4 bölgesi için belirlenmiştir.



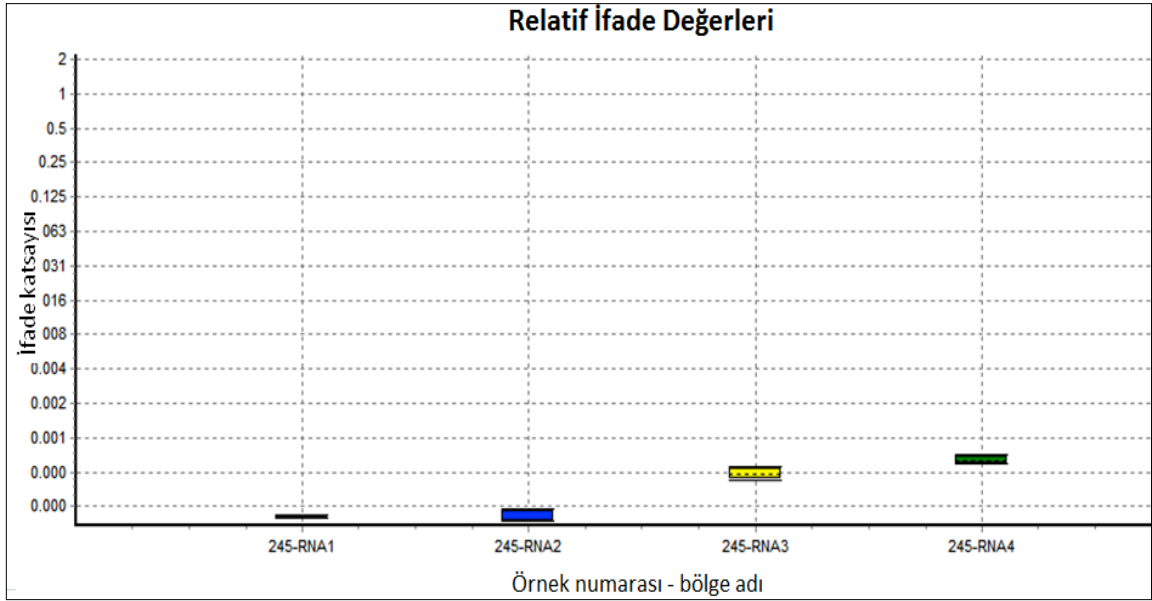
Şekil 5.18.a. 197 gen bankası numarasına sahip *Beta macrorhiza* genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi



Şekil 5.18.b. 239 gen bankası numarasına sahip *Beta macrorhiza* genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi

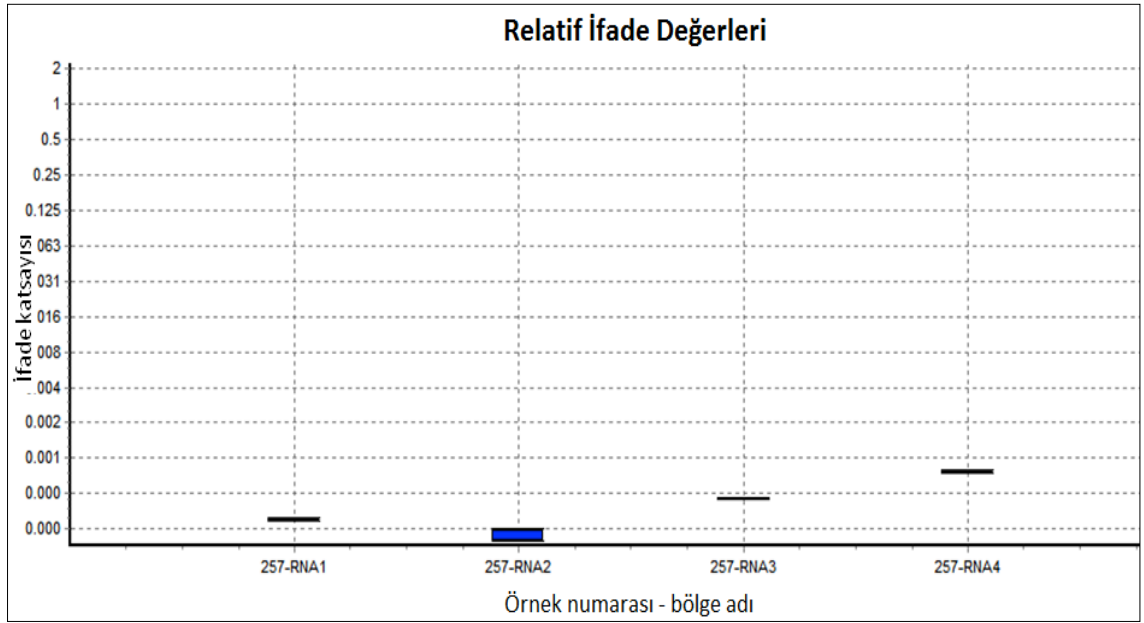


Şekil 5.18.c. 244 gen bankası numarasına sahip *Beta macrorhiza* genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi



Şekil 5.18.d. 245 gen bankası numarasına sahip *Beta macrorhiza* genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi





**Şekil 5.18.e.** 257 gen bankası numarasına sahip *Beta macrorhiza* genotipinde BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 bölgeleri ifadesi

*Beta macrorhiza* genotiplerinde en yüksek ifade BNYVV RNA4 bölgesi için belirlenmiştir. İncelenen tüm *macrorhiza* genotiplerinde virüs RNA bölgeleri için benzer olarak oldukça düşük ifade belirlenmiştir. Bu genotiplerde ayrıca RNA4 bölgesinden sonra RNA3 bölgesi için diğer bölgelere göre belirgin ifade belirlenmiştir.

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Şeker pancarı üretiminde ekonomik düzeyde ürün kaybına neden olabilen en önemli virüslerden biri olan BNYVV, *Polymyxa betae* Keskin vektörü aracılığıyla şeker pancarı köklerine bulaşmaktadır. BNYVV genomu genellikle değişen büyüklüklerde dört adet RNA içermekte ve bu RNA bölgeleri içeriklerine göre virüsün patojenitesi değişebilmektedir (35). Patojenitenin yanısıra belirlenmiş tolerans kaynaklarına yönelik de virüste direnç gelişebilmekte ve bitki dayanıklılığı/toleransı kırılabilmektedir. Aynı zamanda yapılan çalışmalara bakıldığında (9,13,44,45), çalışmaların bölgesel BNYVV ırkları ve patojenitelerinin belirlenmesi üzerine yoğunlaştığı görülmektedir.

*Beta* ve *Corollinae* seksiyonlarında, bu hastalığa veya taşıyıcısı *Polymyxa betae* mantarına tolerant genotipler bulunmaktadır. Bu konuda yürütülen çalışmalar da bölgesel kaynakların taranması ve tolerant genotiplerin belirlenmesi üzerine yoğunlaşmıştır. (13,39,44). Bu sebeplerle bakıldığında; ulusal gen kaynaklarımızın BNYVV patojenitelerinin belirlenmesi ve gen tespiti kaynağı olabilecek yerel yabancı pancar gen kaynaklarımızın Rhizomania' ya toleransları açısından taranması büyük önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında, BNYVV virüsü gen bölgelerinin Real Time PCR'a dayalı ifade analizleri ile *Beta* ve *Corollinae* yerel yabancı genotiplerinde tolerans düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu tezde gen ifadesi analizleri yapılan *Beta* ve *Corollinae* seksiyonlarına ait genotiplerde oldukça düşük BNYVV RNA bölgeleri ifade belirlenmiştir (Şekil 5.12.a., Şekil 5.12.b., Şekil 5.12.c., Şekil 5.12.d., Şekil 5.12.e., Şekil 5.13.a., Şekil 5.13.b., Şekil 5.13.c., Şekil 5.13.d., Şekil 5.13.e., Şekil 5.14.a., Şekil 5.14.b., Şekil 5.14.c., Şekil 5.14.d., Şekil 5.14.e., Şekil 5.15.a., Şekil 5.15.b., Şekil 5.15.c., Şekil 5.15.d., Şekil 5.15.e., Şekil 5.16.a., Şekil 5.16.b., Şekil 5.16.c., Şekil 5.16.d., Şekil 5.16.e., Şekil 5.17.a., Şekil 5.17.b., Şekil 5.17.c., Şekil 5.17.d., Şekil 5.17.e., Şekil 5.18.a., Şekil 5.18.b., Şekil 5.18.c., Şekil 5.18.d., Şekil 5.18.e., Şekil 5.19.). Tüm genotiplerdeki tüm RNA bölgeleri ifadelerine bakıldığında da oldukça düşük ifade seviyesi belirlenmiş olup, RNA bölgeleri ifadesi açısından yüksek farklılıklar belirlenmemiştir. *B. maritima*, *B. adanensis*, *B. trigyna*, *B. lomatozona*, *B. corolliflora*, *B. intermedia*, *B. macrorrhiza*' ya ait genotipler arasında da genellikle düşük ifade farklılıkları belirlenmiştir. Çok küçük farklılıkla birlikte *Corollinae* seksiyonuna ait

örneklerde daha düşük BNYVV RNA1, RNA2, RNA3 ve RNA4 ifadesi belirlenmiştir. BNYVV' ye karşı yapılan tolerans çalışmalarında *B. maritima*, *B. trigyna*, *B. lomatogona*, *B. corolliflora*, *B. intermedia* genotiplerinde toleransın belirlendiği (44,45) çalışmalarda belirtilmiştir. Yapılan araştırmalara uygun olarak bu tez çalışmasında da BNYVV'ye ait RNA bölgelerinin yabani pancar gen kaynaklarındaki ifadesi düşük bulunmuş olup BNYVV'ye karşı tolerans gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca Rhizomania' ya karşı geliştirilmeye çalışılan dayanıklı hat çalışmaları, daha çok BNYVV' ye karşı tolerans kaynaklarına yoğunlaşmış olsa da vektöre karşı tolerans mekanizmalarının ve kaynaklarının belirlenmesine yönelik çalışmalar da devam etmektedir. Autotetraploid (4x) *B. corolliflora* başta olmak üzere *corollinae türlerinin* soğuk, yüksek sıcaklığa ve kuraklığa dayanıklı türler olduğu, *B. lomatogona'nın* ise tuza toleranslı türler olduğu bilinmektedir. Ayrıca bu seksiyonda az sayıda da olsa virus (rhizomania) ve funguslara (*P. Betae*) tam dayanıklı genotiplerin bulunduğu özellikle *B. corolliflora* ve *B. macrorhiza'nın* tepe kıvrıcıklığı hastalığı virüsüne (curly top) ve BNYVV'ye karşı dayanıklılık genlerini taşıdığı tespit edilmiştir. Pancarda *Polymyxa betae'* ye toleransına yönelik yapılan çok az sayıda çalışma yürütülmüş, bu çalışmalarda da *Corollinae* seksiyonuna ait *B. lomatogona*, *B. corolliflora*, *B. intermedia*, *B. macrorhiza* genotiplerinde vektöre karşı tolerans belirlenmiş ve BNYVV birikiminin az olduğu tespit edilmiştir (44,45). Bu tez çalışmasında *Corollinae* seksiyonuna ait genotiplerde kısmi daha az BNYVV ifadesinin belirlenmiş olması, bu genotiplerde ayrıca literatürde belirlenmiş olan vektör toleransından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Tüm *Corollinae* genotiplerinde özellikle RNA2 ve RNA4 ifadesinin diğer RNA bölgelerine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. RNA2 hücre-hücre etkileşimleri aracılığı ile virüs genomunun farklı hücrelere giriş yapabilmesinde rol oynarken aynı zamanda replikasyonunda, translasyonda ve yeni oluşan virüs genomları için zarf proteinin sentezinin artırılmasında görev almaktadır. RNA4' ün ise virüsün vektörüyle köklere girişinde anahtar rol oynadığı ve bu girişin izolatlarda RNA3 bulunduğu daha etkin gerçekleştiği bilinmektedir (6,16). Bu sebeple, virüsün temel mekanizmalarının gerçekleştirilmesinde görevli olan bu bölgelerin ifadelerinin farklılığı daha tolerant olabilecek genotiplerde de belirlenebilmektedir.

Seksiyonlardaki genotiplerin dayanıklılığın yanısıra genotipler arasında da tolerans farklılıklarının olabileceği belirlenmiştir. 29 gen bankası numaralı Beta *maritima* /İzmir ve

260 gen bankası numaralı Beta *trigyna*/ Erzurum genotiplerinde belirlenen ifade farklılıkları seksiyonlarda daha geniş genotip taramalarının yapılması gerekliliğini göstermektedir.

Bulaşıklık ve ifade düzeyleri ELISA ve TaqMan prob/Real Time PCR ifade analiz yöntemleriyle belirlenmiştir. TaqMan Real time PCR/prob yönteminde de ELISA testi sonuçlarına (Çizelge 5.1.), paralel olarak oldukça düşük bulaşıklık düzeyleri belirlenmiştir. Oldukça düşük ELISA bulaşıklık düzeylerine rağmen oldukça hassas spesifik TaqMan prob yöntemi ile çoğunlukla tolerant olan genotiplerdeki çok küçük ifade farklılıkları dahi belirlenmiştir. (39) tarafından yapılan çalışmada da benzer olarak hem Elisa testi hem de Taqman Real Time PCR/prob yöntemi ile bulaşıklık ve RNA2, RNA5 ifadelerine bakılmış, Elisa testinin sonuç veremediği oldukça düşük bulaşıklık konsantrasyonlarındaki Taqman prob yöntemiyle alınan başarılı sonuçlar belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında da benzer olarak ELISA testi sonucunda oldukça düşük ya da negatif sonuç verebilen düşük konsantrasyonlardaki bulaşıklıklar TaqMan Real Time PCR prob yöntemi ile ifade düzeyinde belirlenmiştir.

Yabani pancar gen kaynaklarında *Rhizomania*'ya dayanıklı genotiplerin belirlenmesine yönelik olan bu tezde; çimlendirilmesi çok zor olan yabani pancar genotiplerinin çimlendirme basamaklarının optimizasyonu sağlanmış, BNYVV virüsü gen bölgelerinin Taqman Real Time PCR'a dayalı ifade analizleri ile seksiyonlar ya da genotipler arasındaki farklılıkların gösterilebileceği belirlenmiş olup geleceğe yönelik araştırmalarda yabani pancar dayanıklılık gen havuzunun oluşturulması açısından ilk ve ön çalışma olarak tamamlanmıştır. Ulusal yabani pancar dayanıklılık gen havuzunun oluşturulabilmesi çalışmanın genişletilerek gen bankasında bulunan tüm genotiplerin taranması ve *Rhizomania*'ya karşı tolerans düzeylerinin belirlenmesiyle mümkün olabilecektir.

## KAYNAKLAR

- 1 Anonim. 2010. Available at: <http://www.konyaseker.com.tr/Upload/pdf/seker-pancari.pdf>.
- 2 Koenig R, Lennefors B-L. Molecular analyses of European A, B and P type sources of Beet necrotic yellow vein virus and detection of the rare P type in Kazakhstan. *Arch. Virol.* 2000;**145**(8):1561–1570.
- 3 Putz C, Pinck M, Fritsch C, Pinck L. Identification of the 3' - and 5' -ends of beet necrotic yellow vein virus RNAs. *FEBS Lett.* 1983;**156**(1):41–46.
- 4 Özgör OE. *Türkiye pancar ve pazıları : (Beta L. of Turkey)*. 216th ed. Ankara: NA; 1992:112.
- 5 Tamada T, Uchino H, Kusume T, Saito M. RNA 3 deletion mutants of beet necrotic yellow vein virus do not cause rhizomania disease in sugar beets. *Phytopathology* 1999;**89**(11):1000–1006.
- 6 Tamada T, Shirako Y, Abe H, Saito M, Kiguchi T, Harada T. Production and pathogenicity of isolates of beet necrotic yellow vein virus with different numbers of RNA components. *J. Gen. Virol.* 1989;**70**:3399–3409.
- 7 Chen J, Wilson T. Taxonomy of rigid rod-shaped viruses transmitted by fungi. *Agronomie* 1995. doi:10.1051/agro:19950706.
- 8 Hehn A, Bouzoubaa S, Bate N, Twell D, Marbach J, Richards K, Guilley H, Jonard G. The small cysteine-rich protein P14 of beet necrotic yellow vein virus regulates accumulation of RNA 2 in cis and coat protein in trans. *Virology* 1995;**210**:73–81.
- 9 Schmidlin L, DE Bruyne E, Weyens G, Lefebvre M, Gilmer D. Identification of differentially expressed root genes upon rhizomania disease. *Mol. Plant Pathol.* 2008;**9**(6):741–51.
- 10 Schirmer A, Link D, Cognat V, Moury B, Beuve M, Meunier A, Bragard C, Gilmer D, Lemaire O. Phylogenetic analysis of isolates of Beet necrotic yellow vein virus collected worldwide. *J. Gen. Virol.* 2005;**86**(10):2897–911.
- 11 Rush CM, Liu H-Y, Lewellen RT, Acosta-Leal R. The Continuing Saga of Rhizomania of Sugar Beets in the United States. *Plant Dis.* 2006;**90**(1):4–15.
- 12 Koenig R, Haeberlé AM, Commandeur U. Detection and characterization of a distinct type of beet necrotic yellow vein virus RNA 5 in a sugarbeet growing area in Europe. *Arch. Virol.* 1997;**142**(7):1499–1504.
- 13 Ward L, Koenig R, Budge G, Garrido C, McGrath C, Stubbley H, Boonham N. Occurrence of two different types of RNA-5-containing beet necrotic yellow vein virus in the UK. *Arch. Virol.* 2007;**152**(1):59–73.
- 14 Pavli OI, Stevanato P, Biancardi E, Skaracis GN. Achievements and prospects in breeding for rhizomania resistance in sugar beet. *F. Crop. Res.* 2011;**122**(3):165–172.
- 15 Wisler GC, Lewellen RT, Sears JL, Wasson JW, Liu H-Y, Wintermantel WM. Interactions Between Beet necrotic yellow vein virus and Beet soilborne mosaic virus in Sugar Beet. *Plant Dis.* 2003;**87**(10):1170–1175.
- 16 McGrann GRD, Grimmer MK, Mutasa-Göttgens ES, Stevens M. Progress towards the understanding and control of sugar beet rhizomania disease. *Mol. Plant Pathol.* 2009;**10**(1):129–41.

- 17 Desoignies N, Carbonell J, Moreau J-S, Conesa a., Dopazo J, Legrève a. Molecular interactions between sugar beet and *Polymyxa betae* during its life cycle. *Ann. Appl. Biol.* 2014;**164**(2):244–256.
- 18 Asher MJC, Grimmer MK, Mutasa-Goettgens ES. Selection and characterization of resistance to *Polymyxa betae*, vector of Beet necrotic yellow vein virus, derived from wild sea beet. *Plant Pathol.* 2009;**58**(2):250–260.
- 19 Ciafardini G. Evaluation of *Polymyxa betae* Keskin contaminated by beet necrotic yellow vein virus in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991;**57**(6):1817–1821.
- 20 Lubicz JV, Rush CM, Payton M, Colberg T. Beet necrotic yellow vein virus accumulates inside resting spores and zoosporengia of its vector *Polymyxa betae* BNYVV infects *P. betae*. *Viol. J.* 2007;4:37.
- 21 Reamon-Ramos SM, Wricke G. A full set of monosomic addition lines in *Beta vulgaris* from *Beta webbiana*: morphology and isozyme markers. *Theor. Appl. Genet.* 1992;84:411–418.
- 22 Bagatta M, Pacifico D, Mandolino G. Evaluation of the Osmotic Adjustment Response within the Genus *Beta*. *J. Sugarbeet Res.* 2008;**45**(3):119–133.
- 23 Mueller J. New pathotypes of the beet cyst nematode (*Heterodera schachtii*) differentiated on alien genes for resistance in beet (*Beta vulgaris*). *Fundam. Appl. Nematol.* 1998;**21**(5):519–526.
- 24 Satoh M, Kubo T, Mikami T. The Owen mitochondrial genome in sugar beet (*Beta vulgaris* L.): possible mechanisms of extensive rearrangements and the origin of the mitotype-unique regions. *Theor. Appl. Genet.* 2006;**113**(3):477–84.
- 25 Satoh M, Kubo T, Nishizawa S, Estiati a, Itchoda N, Mikami T. The cytoplasmic male-sterile type and normal type mitochondrial genomes of sugar beet share the same complement of genes of known function but differ in the content of expressed ORFs. *Mol. Genet. Genomics* 2004;**272**(3):247–56.
- 26 Moritani M, Taguchi K, Kitazaki K, Matsuhira H, Katsuyama T, Mikami T, Kubo T. Identification of the predominant nonrestoring allele for Owen-type cytoplasmic male sterility in sugar beet (*Beta vulgaris* L.): development of molecular markers for the maintainer genotype. *Mol. Breed.* 2013;**32**(1):91–100.
- 27 Hagihara E, Matsuhira H, Ueda M, Mikami T, Kubo T. Sugar beet BAC library construction and assembly of a contig spanning Rf1, a restorer-of-fertility gene for Owen cytoplasmic male sterility. *Mol. Genet. Genomics* 2005;274:316–23.
- 28 Barzen E, Mechelke W, Ritter E, Seitzer JF, Salamini F. RFLP markers for sugar beet breeding: Chromosomal linkage maps and location of major genes for rhizomania resistance, monogerm and hypocotyl colour. *Plant J.* 1992;**2**(3):601–611.
- 29 Amiri R, Mesbah M, Moghaddam M, Bihamta MR, Mohammadi S a., Norouzi P. A new RAPD marker for beet necrotic yellow vein virus resistance gene in *Beta vulgaris*. *Biol. Plant.* 2009;**53**(1):112–119.
- 30 Grimmer MK, Trybush S, Hanley S, Francis S a, Karp A, Asher MJC. An anchored linkage map for sugar beet based on AFLP, SNP and RAPD markers and QTL mapping of a new source of resistance to Beet necrotic yellow vein virus. *Theor. Appl. Genet.* 2007;114:1151–60.
- 31 Scholten OE, Klein-Lankhorst RM, Esselink DG, De Bock TS, Lange W. Identification and mapping of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers linked to resistance

- against beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in Beta accessions. *Theor. Appl. Genet.* 1997;**94**(1):123–30.
- 32 Ratti C, Clover GRG, Autonell CR, Harju V a, Henry CM. A multiplex RT-PCR assay capable of distinguishing beet necrotic yellow vein virus types A and B. *J. Virol. Methods* 2005;**124**(1-2):41–7.
- 33 Liu H-Y, Lewellen RT. Distribution and molecular characterization of resistance-breaking isolates of Beet necrotic yellow vein virus in the United States. *Plant Dis.* 2007. doi:10.1094/PDIS-91-7-0847.
- 34 Panella L, Lewellen RT. Broadening the genetic base of sugar beet: introgression from wild relatives. *Euphytica* 2006;**154**(3):383–400.
- 35 Paul H, Henken B, Scholten OE, De Bock TSM, Lange W. Resistance to *Polymyxa betae* and Beet Necrotic Yellow Vein Virus in Beta Species of the Section Corollinae. *J. Sugarbeet Res.* 1994;**31**:1–6.
- 36 Biancardi E, Lewellen RT, De Biaggi M, Erichsen AW, Stevanato P. The origin of rhizomania resistance in sugar beet. *Euphytica* 2002;**127**(3):383–397.
- 37 Gidner S, Lennefors B-L, Nilsson N-O, Bensefelt J, Johansson E, Gyllenspetz U, Kraft T. QTL mapping of BNYVV resistance from the WB41 source in sugar beet. *Genome* 2005;**48**:279–85.
- 38 Grimmer MK, Kraft T, Francis S a., Asher MJC. QTL mapping of BNYVV resistance from the WB258 source in sugar beet. *Plant Breed.* 2008;**127**:650–652.
- 39 Harju V a, Skelton A, Clover GRG, Ratti C, Boonham N, Henry CM, Mumford R a. The use of real-time RT-PCR (TaqMan) and post-ELISA virus release for the detection of Beet necrotic yellow vein virus types containing RNA 5 and its comparison with conventional RT-PCR. *J. Virol. Methods* 2005;**123**:73–80.
- 40 Nolan T, Hands RE, Bustin S a. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.* 2006;**1**(3):1559–1582.
- 41 Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantification. *Biotechniques* 2005;**39**(1):75–85.
- 42 Morris T, Robertson B, Gallagher M, Morris T, Robertson B, Gallagher M. Rapid reverse transcription-PCR detection of hepatitis C virus RNA in serum by using the TaqMan fluorogenic detection system . Rapid Reverse Transcription-PCR Detection of Hepatitis C Virus RNA in Serum by Using the TaqMan Fluorogenic Detection System. *J. Clin. Microbiol.* 1996;**34**(12):2933–2936.
- 43 Meunier A, Schmit J, Stas A, Kutluk N, Bragard C. Multiplex Reverse Transcription-PCR for Simultaneous Detection of Beet Necrotic Yellow Vein Virus, Beet Soilborne Virus, and Beet Virus Q and Their Vector *Polymyxa betae* KESKIN on Sugar Beet. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003;**69**(4):2356–2360.
- 44 Scholten OE, Lange W. Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet: A review. *Euphytica* 2000;**112**:219–231.
- 45 Frese L, Desprez B, Ziegler D. *Potential of Genetic Resources and Breeding Strategies for Base-broadening in Beta.*; 2001. Available at: [http://www.ecpgr.cgiar.org/fileadmin/templates/ecpgr.org/upload/NW\\_and\\_WG\\_UPLOADS/BETA\\_miscellaneous/article\\_Beta.pdf](http://www.ecpgr.cgiar.org/fileadmin/templates/ecpgr.org/upload/NW_and_WG_UPLOADS/BETA_miscellaneous/article_Beta.pdf).

**EK 1: 35 yabancı pancar genotipinde 3 teknik tekrara ait ct (cycle threshold) değerleri**

Gen bankası no- teknik tekrar	Tür adı/Toplandığı il	Glutamine synthetase	RNA1	RNA2	RNA3	RNA4
1-1	<i>Beta corolliflora</i> /Erzurum	24,21	33,99	32,51	34,01	35,3
1-2		24,40	34,13	32,68	34,10	35,45
1-3		24,00	34,20	32,78	34,20	35,69
2-1	<i>Beta corolliflora</i> /Kars	24,90	34,24	28,80	34,27	35,13
2-2		24,71	34,45	28,89	34,30	35,41
2-3		24,13	34,40	28,99	34,39	35,65
3-1	<i>Beta corolliflora</i> /Ağrı	25,00	34,49	33,21	34,25	35
3-2		24,90	34,51	33,67	34,31	35,36
3-3		24,55	34,68	33,76	34,36	35,31
81-1	<i>Beta corolliflora</i> / Bilecik	24,43	34,17	33,66	34,44	35,18
81-2		24,35	34,33	33,99	34,55	35,19
81-3		24,88	34,29	34,00	34,66	35,29
89-1	<i>Beta corolliflora</i> /Bilecik	24,33	34,70	34,13	34,78	35,29
89-2		24,77	34,68	34,24	34,66	35,28
89-3		24,69	34,77	34,21	34,50	35,33
4-1	<i>Beta maritima</i> /Antalya	27,68	35,31	36,32	36,56	35,78
4-2		27,78	35,35	36,40	36,59	35,88
4-3		27,90	35,68	36,45	36,69	35,99
6-1	<i>Beta maritima</i> /Adana	27,50	35,78	29,99	36,77	35,37
6-2		27,55	35,88	30,31	36,80	35,77
6-3		27,66	35,90	30,23	36,50	35,65
29-1	<i>Beta maritima</i> /İzmir	27,90	28,89	29,51	29,20	25,77
29-2		27,81	28,99	29,57	29,17	25,66
29-3		27,78	28,67	29,67	29,30	25,37
27-1	<i>Beta maritima</i> /İzmir	27,13	37,78	34,21	36,13	35,13
27-2		27,27	37,35	34,23	36,18	35,2
27-3		27,37	37,50	34,65	36,20	35,33



8-1	<i>Beta maritima</i> /Trabzon	27,88	36,45	35,40	35,40	35,43
8-2		27,75	36,56	35,43	35,78	35,49
8-3		27,91	36,60	35,55	35,66	35,66
5-1	<i>Beta adanensis</i> /Adana	26,13	35,35	33,17	34,21	35,76
5-2		26,20	35,45	33,65	34,45	35,89
5-3		26,50	35,57	33,25	34,66	35,69
25-1	<i>Beta adanensis</i> /Adana	26,33	35,88	34,11	36,43	35,79
25-2		26,47	35,50	34,24	36,36	35,88
25-3		26,13	35,67	34,40	36,51	35,77
28-1	<i>Beta adanensis</i> /Adana	26,80	33,57	34,90	34,45	35,66
28-2		26,91	33,78	34,70	34,56	35,89
28-3		26,75	33,69	34,66	34,69	35,79
39-1	<i>Beta adanensis</i> /Çanakkale	26,99	34,67	34,54	33,45	34,99
39-2		27,13	34,78	34,69	33,33	35,13
39-3		26,89	34,88	34,99	33,67	35,23
53-1	<i>Beta adanensis</i> / Adana	26,15	33,45	33,14	34,65	35,31
53-2		26,30	33,67	33,29	34,77	35,4
53-3		26,37	33,77	33,67	34,88	35,48
12-1	<i>Beta lomatogona</i> /Erzurum	25,25	36,88	31,13	38,29	34,26
12-2		25,35	36,99	31,25	38,12	34,27
12-3		25,40	37,00	31,40	38,23	34,37
224-1	<i>Beta lomatogona</i> /Isparta	25,60	36,67	31,80	38,43	35,29
224-2		25,66	36,77	31,77	38,30	34,88
224-3		25,78	36,81	31,90	38,33	34,99
13-1	<i>Beta lomatogona</i> /Erzurum	25,13	36,77	32,13	38,75	35,4
13-2		25,20	36,89	32,20	38,70	35,22
13-3		25,49	36,88	32,27	38,55	35,56
14-1	<i>Beta lomatogona</i> /Erzurum	25,67	36,78	31,80	38,58	35,55
14-2		25,55	36,70	31,89	38,65	35,66
14-3		25,80	36,90	31,88	38,70	35,69
222-1	<i>Beta lomatogona</i> /Isparta	25,90	36,13	32,67	38,65	35,8

222-2		25,77	36,33	32,50	38,75	35,77
222-3		24,55	36,27	32,59	38,78	35,6
260-1	<i>Beta trigyna</i> /Erzurum	26,78	28,77	34,13	30,30	34,82
260-2		26,78	28,88	34,20	30,33	34,8
260-3		26,50	28,90	34,25	30,54	34,6
47-1	<i>Beta trigyna</i> /Bolu	26,55	28,17	33,89	30,20	34,55
47-2		26,60	28,29	33,79	30,33	34,66
47-3		26,66	28,28	33,75	30,45	34,7
48-1	<i>Beta trigyna</i> /Kütahya	26,21	33,15	34,56	38,13	34,89
48-2		26,18	33,20	34,67	38,42	34,66
48-3		26,25	33,27	34,78	38,45	34,77
125-1	<i>Beta trigyna</i> /Eskişehir	26,67	33,40	34,70	38,43	34,67
125-2		26,88	33,50	34,77	38,38	34,78
125-3		26,76	33,33	34,36	38,40	34,7
227-1	<i>Beta trigyna</i> /Bilecik	26,34	33,59	34,89	38,55	34,9
227-2		26,45	33,67	34,70	38,41	34,88
227-3		26,67	33,78	34,34	38,49	34,69
19-1	<i>Beta intermedia</i> /Eskişehir	25,56	37,80	36,87	38,55	37,13
19-2		25,77	37,88	36,78	38,67	37,4
19-3		25,88	37,70	36,50	38,49	37,55
20-1	<i>Beta intermedia</i> /Eskişehir	25,13	37,23	36,66	38,33	37,41
20-2		25,24	37,40	36,77	38,56	37,21
20-3		25,47	37,45	36,80	38,48	37,33
21-1	<i>Beta intermedia</i> /Eskişehir	25,15	37,88	36,90	38,27	37,13
21-2		25,54	37,99	36,89	38,65	37,23
21-3		25,51	37,78	36,94	38,58	37,39
22-1	<i>Beta intermedia</i> /Eskişehir	25,44	37,56	36,59	38,45	37,45
22-2		25,78	37,77	36,89	38,50	37,55
22-3		25,88	37,65	36,77	38,67	37,67
23-1	<i>Beta intermedia</i> /Eskişehir	25,97	37,46	36,90	37,99	37,78
23-2		25,82	37,67	36,99	37,90	37,99

23-3		25,85	37,77	37,00	37,89	37,66
244-1	<i>Beta macrorhiza</i> /Erzincan	26,56	38,45	38,56	37,21	36,99
244-2		26,39	38,27	38,67	37,30	37,2
244-3		26,45	38,45	38,90	37,41	37,25
245-1	<i>Beta macrorhiza</i> /Erzincan	26,30	38,65	38,66	37,13	36,8
245-2		26,13	38,45	38,55	37,20	36,9
245-3		26,26	38,50	38,33	37,49	36,95
257-1	<i>Beta macrorhiza</i> /Kastamonu	26,40	38,13	38,88	37,57	36,77
257-2		26,45	38,20	38,77	37,60	36,88
257-3		26,57	38,27	38,90	37,68	36,91
197-1	<i>Beta macrorhiza</i> /Erzincan	26,48	38,30	39,00	37,44	36,89
197-2		26,66	38,37	38,88	37,66	36,81
197-3		26,88	38,47	38,77	37,88	36,78
239-1	<i>Beta macrorhiza</i> /Erzincan	26,45	38,50	38,78	37,67	37,14
239-2		26,13	38,40	38,99	37,89	37,2
239-3		26,51	38,33	38,77	37,90	37,21

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Filiz MUTAF

**Doğum Yeri:** Rusçuk

**Doğum Tarihi:** 21.11.1988

**Medeni Hali:** Bekar

**Yabancı Dili:** İngilizce

### Eğitim Durumu

**Lise:** Mehmetçik Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi (2003 - 2007)

**Lisans:** Hacettepe Üniversitesi - Biyoloji Bölümü (2007 - 2011)

### İş Tecrübesi

#### **Kurumu:**

Ankara Üniversitesi

Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı

#### **Görevi:**

Araştırmacı

#### **Yılları:**

2012-2015

### Yayımlar

#### **SCI'da Yer Alan Makaleler:**

- Akkurt M, Çakır A, Shidfar M, **Mutaf F**, Söylemezoğlu G (2013), Using seedlessness-related molecular markers in grapevine breeding for seedlessness via marker-assisted selection into Muscat of Hamburg × Sultani progeny Turk J Biol, 37: 101-105,
- C, Yüksel, **F**, **Mutaf**, İ, Demirtaş, G, Öztürk, M, Pektaş, A, Ergül (2013), Characterization of Anatolian traditional quince cultivars, based on microsatellite markers, Genet, Mol, Res, 12 (4): 5880 – 5888,
- Burak M, Ergül A, Kazan K, Akçay M,E,, Yüksel C, Bakır M, **Mutaf F**, Akpınar A,E, Yaşasın S,, Ayanoğlu H, (2014), Genetic analysis of Anatolian

apples (*Malus* sp.) by simple sequence repeats, Journal of Systematics and Evolution, 52, 4,

- Akçay M,E,, Burak M, Kazan K, Yüksel C, **Mutaf F**, Bakır M, Ayanoglu H,, Ergül A, (2014), Genetic analysis of Anatolian pear germplasm by simple sequence repeats, 164(3):441-452,

#### **Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:**

- Ali ERGÜL, Birsen ÇAKIR, **Filiz MUTAF**, Umut KİBAR, Microarray analysis of endoplasmic reticulum (ER) and salt stress transcriptomes in grapevine rootstocks, 11th International Conference on Grapevine Breeding and Genetics, in Yanqing County, Beijing, 28 July- 2 August, 2014,

#### **Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler:**

- Masum BURAK, Melike BAKIR, Kemal KAZAN, Mehmet Emin AKÇAY, Canan YÜKSEL, **Filiz MUTAF**, A, Semih YAŞASIN, Hamit AYANOĞLU, Ali ERGÜL, Türkiye Elma Gen Kaynaklarının Simple Sequence Repeats (SSRs)'a Dayalı Genetik Karakterizasyonu, 26-29 Ekim 2013, Ulusal Tarım Kongresi, Antalya,
- Birsen ÇAKIR, **Filiz MUTAF**, Umut KİBAR, Ali ERGÜL, Endoplazmik Retikulum (Er) ve Tuzluluk Stresi Transkriptomlarının Asma Anacında Mikrodizin (Mikroarray) Analizleri, (Sözlü sunum), Ulusal Tarım Kongresi, 26-28 Ekim 2013, Antalya,
- GA Zenginleştirilmiş Kekik (*Origanum onites* L.) Kütüphanelerinden Genomik SSRs (Simple Sequence Repeats) Markörlerinin Geliştirilmesi, Ali ERGÜL, **Filiz MUTAF**, (Poster), Ulusal Tarım Kongresi, 26-28 Ekim 2013, Antalya.