

**KİLİS 7 ARALIK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI BİBER GENOTİPLERİNİN PVYV (Pepper vein yellows virus)'YE
TEPKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

ALAITTİN APALAK

DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. BEKİR BÜLENT ARPACI

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

EYLÜL 2017

KİLİS

KABUL VE ONAY SAYFASI

Yrd. Doç. Dr. Bekir Bülent ARPACI danışmanlığında, Alaittin APALAK tarafından hazırlanan “Bazı Biber Genotiplerinin PVYV (Pepper vein yellow virus)’ne Tepkilerinin Belirlenmesi” adlı tez çalışması 13/10/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Kilis 7 Aralık Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı, Adı Soyadı (Kurumu)	İmza
--------------	--------------------------------	------

Başkan

Üye

Üye

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/...../201... tarih ve/..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Tez No:

Bu tez çalışmasıtarafından desteklemiştir.

Yrd. Doç. Dr. Hülya DEDE
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI BİBER GENOTİPLERİNİN PVYV (*Pepper vein yellows virus*)'YE TEPKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Alaittin APALAK

Kilis 7 Aralık Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Bekir Bülent ARPACI

YIL: 2017 Sayfa: 38

Biberlerde Biber Sarı Damar Virüsü (PVYV) dayanıklılık kaynağı belirlemek amacı ile 30 biber genotipinde yaprak bitleri aracılığı ile ve arazi koşullarında çalışmalar yürütülmüştür. Çalışmalar sonucunda yaprak ve yaprak damar aralarındaki renk açılması, bitkide genel sarılık, meyvedeki şekil bozukluğu ve renk değişimleri gibi simptomatolojik gözlemler dikkate alınarak bitki yaprak ve meyvelerinden örnekler toplanmıştır. DAS-ELISA yöntemi ile virüsün genotiplerde multiplikasyonu belirlenmiş etmen RT-PCR ve sekans analizi sonucu doğrulanmıştır. Çalışmada vektörlerle yapılan bulaştırmalar ve arazi çalışmaları sonucu Yolo Wonder, Yolo Y, W4 ve Sangria çeşitlerinin etmene duyarlı olduğu belirlenmiştir. PM 1615=HD330, PM 1050=Bouso 10, PM 1088=Bojonegro ve PM 1694=Mayfouq genotiplerinin etmene dayanıklı olabileceği ancak vektörler aracılığı etmen ile bulaştırılarak doğrulanması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler : PVYV, Biber, Yaprak bitleri, Dayanıklılık

ABSTRACT

MSc. Thesis

DETERMINATION OF SOME PEPPER GENOTYPES RESPONSE TO PVYV (Pepper vein yellows virus)

Alaittin APALAK

Kilis 7 Aralık University

The Institute for Studies in Sciences and Engineering

Department of Horticulture

Supervisor: Assist. Prof. Dr.Bekir Bülent ARPACI

Year: 2017 Page: 38

In this study in order to determine the source of resistance to PVYV in the 30 pepper genotypes, samples from plant leaves and fruits were collected considering the simptomatological observations such as coloring between leaves and leaf veins, general jaundice in the plant, deformations in the fruit and color changes after aphid transmission and open field studies. Multiplication of the virus on the pepper genotypes had been determined by DAS-ELISA and confirmed by RT-PCR and sequence analysis. As a result of the aphid transmission it was determined that Yolo Wonder, Yolo Y, W4 and Sangria were susceptible to the disease and PM 1615=HD330, PM: 1050=Bousso 10, PM 1088=Bojonegro ve PM 1694=Mayfouq genotypes were found be able to resist to pathogen but the resistance have to confirmed by aphid transmission.

Key Words : PVYV, Pepper, Aphids, Resistance

TEŞEKKÜR

Bana bu araştırma konusunu veren ve yüksek lisans programı süresince yardımlarını benden esirgemeyen, alışmalarım esnasında her türlü desteğini aldığım, her türlü özveriye gösteren değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Bekir Bülent ARPACI' ya, teőekkürlerimi sunarım.

ELISA çalışmalarında ve örneklemeleerde bana yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. B. Bülent ARPACI' ya teőekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans tez jürisinde yer olan hocalarıma tezimin biçimlenmesinde ve değerlendirilmesinde verdikleri olumlu katkılardan dolayı teşekkür ederim.

ALAIİTİN APALAK

KİLİS 2017

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1.GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
3.MATERYAL ve METOT.....	14
3.1.Materyal.....	14
3.1.1. Bitkisel Materyal.....	14
3.1.2. Polerovirüslerin Biber Bitkilerine Taşınmasında Kullanılan Yaprak Bitleri	16
3.1.2.1. Serolojik Çalışmalar Çalışmalarda Kullanılan Materyal.....	17
3.2. Metot.....	17
3.2.1. Çalışmada Kullanılan Biber Çeşitlerinin Yetiştirilmesi.....	17
3.2.2. Yaprak Bitleri İle Polerovirüslerin Taşınma Çalışmaları	19
3.2.3. Açık Alanda Polerovirüslere Dayanıklılığın Belirlenmesi Çalışmaları.....	19
3.2.4. Serolojik Çalışmalar	19
3.2.4.1. DAS-ELISA Testi	20
3.2.5. Viral RNA İzolasyonu.....	21
3.2.6. Tersine Transkripsiyon (Reverse Transcription, RT) ve Tamamlayıcı DNA (cDNA, complementary DNA) Sentezi.....	22
3.2.7. Polimeaz Zincir Reaksiyon (Polymerase chain reaction, PCR).....	22
3.2.8. Sekans Analizi.....	22
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	23
4.1. Yaprak Bitleri İle Polerovirüslerin Taşınması Çalışmaları.....	23

4.2 Açık Alanda Polerovirüslere Dayanıklılığın Belirlenmesi Çalışmaları.....	23
4.3. DAS-ELISA Testi Çalışmaları.....	25
4.4. RT-PCR ve Dizileme Çalışmaları.....	26
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	29
6. KAYNAKLAR.....	30
7. ÖZGEÇMİŞ.....	37
8. EKLER.....	38



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMV:	Alfalfa mosaic virus (Yonca mozaik virüsü)
CMV:	Cucumber mosaic virus (Hıyar mozaik virüsü)
CM344:	Criollo de Morelos 334
CAPS	Kesilip Çoğaltılmış Polimorfik Diziler
DAS:	Double Antibody Sandwich
ELISA:	Enzim ilintili immün test
eIF4E:	Ökaryotik translasyon başlangıç faktörü 4E
FAO:	Gıda ve Tarım Örgütü
ha	Hektar
kb:	Kilobaz
M:	Molar
MAS:	Marker Assisted Selection (Markırlara dayalı seleksiyon)
mg:	Miligram
ml:	Mililitre
mRNA:	Mesajcı RNA
nm:	Nano metre
O.D. ₄₀₅ :	405 nm okuma değeri
PeVeMoV	Pepper veinal mottle virus(Biber damar beneklenme virüsü)
PLRV:	Potato leafroll virus (Patates yaprak kıvrıcıklığı virüsü)
PMMoV:	Pepper mild mottle virus (Biber noktalı benek virüsü)
PVA:	Potato virüs A (Patates A virüsü)
PVM:	Potato virüs M (Patates M virüsü)
<i>Pvr</i> :	Potyvirüslere dayanıklılık lokusu
PVX:	Potato virus X (Patates X virüsü)
PVBV:	Biber çizgili damar Virüsü
PVY:	Potato virus Y (Patates Y virüsü)
RNA:	Ribonükleik asit
TEV:	Tobacco etch virus (Tütün yanıklık virüsü)
TMV:	Tobacco mosaic virus (Tütün mozaik virüsü)
ToMV:	Tomato mosaic virus (Domates mozaik virüsü)
TSWV:	Domates lekeli solgunluk virüsü

TÜİK:	Türkiye İstatistik Kurumu
µl:	Mikrolitre
VPg:	Viral protein kodlayan bölge
CpCDV	<i>Chickpea chlorotic dwarf virüs</i>
BYDV	<i>Barley yellow dwarf virüs</i>
PLRV	<i>Potato leafroll virüs</i>
TuYV	<i>Turnip yellows virüs</i>
CABYV	<i>Cucurbit aphid-borne yellows luteovirus</i>
CP	kılıf proteini
BMVY	<i>Brassica yellows virüs</i>
BMVY	<i>Beet mild yellowing virüs</i>
PVYV	<i>Pepper vein yellows virüs</i>
BChV	<i>Beet chlorosis virüs</i>
MABYV	<i>Melon aphid-borne yellows virüs</i>
SCSV	<i>Subterranean clover stunt virüs</i>
ORF	altı açık okuma çerçevesi
RdRp	RNA'ya bağımlı RNA polimeraz
SNP	tek nükleotid polimorfizm
cDNA	Tamamlayıcı DNA
RT	Tersine Transkripsiyon

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil Adı	SAYFA
Şekil 1. Çalışmada materyal olarak kullanılan genotipler.....	16
Şekil 2. Polerovirüslerle bulaşık biberlerde yaprak bitlerinin beslenmesi...	18
Şekil 3. Polerovirüslü biber üzerinde beslenen yaprak bitlerinin çalışmada kullanılan biber genotiplerine taşınması.....	19
Şekil 4. Yolo Wonder ve YoloY bitkilerine virüs taşıyan vektör yaprakbitleriyle polerovirüslerin taşınması ve yapraklarda PYLCV belirtileri.....	23
Şekil 5. Etmenin açık alanda biber bitkilerinin meydana getirdiği belirtiler..	24
Şekil 6. ELISA plakasında pozitif ve negatif örneklerin görüntüsü.....	25
Şekil 7. Örneklerden elde edilen RT-PCR ürünlerinin sekans kromatogramı	26
Şekil 8. Polerovirüs pozitif örneklerin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	27

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge Adı	SAYFA
Çizelge 1. Çalışmada materyal olarak kullanılan genotipler.....	14
Çizelge 2. ELISA testi sonuçları.....	25



1.GİRİŞ

Biberin insan beslenmesinde kullanımının yaklaşık 7 bin yıl önceye dayandığı, yetiştiriciliğinin ise 5 bin yıldan beri yapıldığı birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Heiser, 1969). Arkeolojik bulgular ışığında biberin anavatanının Amerika kıtası olduğunu ve *Capsicum baccatum* L. türünün ilk kez M.Ö 2000 yıllarında Peru'da yetiştirilmeye başlandığını bildirmiştir. Aztek, Maya ve İnka yerli halkları üzerinde mistik ve ruhani bir etkisi olan biber, uzun yıllar tanrının bir hediyesi olarak kabul görmüştür (Bosland ve Votava, 1999). Türkiye, önemli gen merkezlerinden biri olmakla birlikte bitki genetik kaynakları ve genetik çeşitlilik bakımından dünyadaki en önemli ülkeler arasında yer alır. Küçük, (2001) Anadolu'nun *Capsicum annuum* L. türü için bir mikro gen merkezi olduğunu belirtilmiştir.

Solanaceae familyasına dahil olan *Capsicum* cinsi içerisinde yaklaşık 30 türün bulunduğu bildirilmiştir. Ancak temel olarak *Capsicum annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L., ve *C. pubescens* Ruiz & Pav. olmak üzere 5 tür kültüre alınmıştır.

Biber insan beslenmesinde önemli bir yere sahiptir ve mineral besin maddeleri açısından zengindir. 100 g taze yeşil tatlı biber 1.1g protein, 92.6 g su, 0.2 g yağ 1.4 g selüloz ve 4.2 g karbonhidrat içermekte ve 29 kalori kazandırmaktadır (Günay, 2005). Dünyada toplam 714.188 ha alanda 16.147.559 ton biber üretimiyle Çin ilk sırayı alırken; 143.465 ha alanda 2.732.635 ton üretimiyle Meksika ikinci sıradadır. Türkiye ise 2.127.944 ton biber üretimini 101.000 ha alanda gerçekleştirmektedir. Bu değerle dünyadaki toplam biber üretiminin % 6' sını karşılamaktadır. Ancak verim bakımından incelendiğinde dekardan alınan 2106 kg verimle Dünya'da 36. sıradadır (FAO, 2017).

Biber bitkisinin üretimini birçok abiyotik ve biyotik faktör etkilemektedir. Yanlış veya yetersiz tarımsal uygulamaların yapılması, canlı ve cansız hastalık etmenleri sebebiyle üründe önemli düzeyde verim kayıpları meydana gelmektedir. Sebze üretim alanlarında üretimi sınırlayan biyotik hastalık etmenleri arasında fungus, bakteri ve virüsler yaygın olarak bulunmaktadır. Bu etmenler arasında, kimyasal ve fiziksel yapısı, semptom

oluşturması, boyutu, taşınması, enfeksiyon şekli ve etkin bir mücadelenin olmayışı sebebi ile virüs hastalıklarının önemli bir yeri vardır (Agrios, 1997). Virüs hastalıklarının kontrolünde doğrudan kimyasal mücadele olmadığından, hastalığın yayılmasını engellemek için koruyucu önlemler önem kazanmaktadır. Virüs hastalıklarının kontrolünde erken tanı ve teşhis, etkili vektör virüs kaynağının yok edilmesi ve yabancı ot mücadelesi, sayılabilecek temel koruyucu önlemler arasında yer alır (Demir, 2005).

Türkiye’de biber yetiştiriciliğini olumsuz etkileyen çok sayıda viral etmen rapor edilmiştir. Bir kısmı mekanik olarak temas yoluyla taşınabildiği gibi bazıları, yabancı otlarla, enfekteli tohumla veya vektör böceklerle (yaprakbiti, trips), enfekteli olmayan alanlara doğru taşınmaktadır. Bu kayıpların, daha çok vektörle taşınan virüslerden kaynaklandığından şüphe edilmektedir. Özellikle son on yıl içerisinde biber yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı Güneydoğu ve Doğu Akdeniz bölgelerinde yaprakbitleriyle taşınan virüs enfeksiyonlarını tespit etmek amacıyla yapılan bir araştırmada *Hıyar mozaik virüsü* (CMV), *Yonca mozaik virüsü* (AMV), *Patates X virüsü* (PVX), *Patates Y virüsü* (PVY), *Biber noktalı benek virüsü* (PMMoV) ve *Tütün yanıklık virüsü* (TEV)’nden en az bir tanesi ile enfekteli olduğu belirlenmiştir (Buzkan ve ark., 2006).

Waterhouse ve ark., (1988) biberlerde zarara neden olan viral etmenlerden *Luteoviridae* familyasının *Enamovirus*, *Luteovirus* ve *Polerovirus* olmak üzere üç cinsten oluştuğunu ve *Polerovirus* cinsinde bulunan virüslerin mekanik olarak diğer bitkilere taşınmadığını bildirmiştir. Bu cins içerisinde yer alan PYLCV ve BWYV ilk kez, biberlerde Hatay’dan alınan örneklerin moleküler karakterizasyonu için yapılan detaylı incelemede karışık enfeksiyon olarak belirlenmiştir. Karışık enfeksiyon taşıyan örnekten izole edilen nükleik asit dizi analizleri, virüslerin *Biber sarı yaprak kıvrıcılık virüsü* (*Pepper yellow leaf curl virus*, PYLCV) ve *Pancar batı sarılık virüsü* (*Beet western yellows virus*, BWYV) olduğunu göstermiştir (Buzkan ve ark., 2013).

Polerovirüs cinsi virüsler (familya *Luteoviridae*) önemli bitki patojenleridir. Sebze üretimi yapılan alanlarda sıklıkla büyük verim kayıplarına neden olur. Poleroviral

virionlar, bir icosahedral kılıf içinde kapsüllenmiş tek sarmallı bir pozitif RNA'dan (+ ssRNA) oluşur. Yaprak bitleri tarafından persistent olarak taşınır. Yaprak aralarında sararma, yaprakta renk değişimi, yaprakta kıvrıcılık, ve bodurlaşma belirtileri gösterdiğini bildirmiştir. (Katis ve ark, 2007)

Polerovirus cinsi *Luteoviridae* familyasında bulunup, bu cinste yer alan virüsler yaprakbitleriyle perzistent (sirkülatif) ve propagatif olmayan (vektör içinde çoğalamayan) yolla taşınmaktadır (Feres ve Raccah, 2009).

Özellikle ülkemizde, üretimin artışına paralel olarak söz konusu virüslerin zararı belirgin olarak ortaya çıkmakta ve bu zararın önüne geçmek kimyasal ve kültürel uygulamalarla mümkün olamamaktadır. Bunun en etkin çözümü ise dayanıklı çeşit kullanmaktır. Dünyada olduğu gibi ülkemizde de dayanıklı F₁ çeşitlerin kullanımı yaygınlaşmıştır (Şimşek ve ark., 2015).

Kültür bitkilerinde kalite ve verim kaybına sebep olan virüs hastalıkları ile günümüzde değişik kültürel önlemler kullanılarak mücadele yapılmaktadır. Bunların başında; termoterapi ve doku kültürü gibi yöntemlerle elde edilmiş virüslerden arı üretim materyali kullanılması, ürün münavebesi, çapraz koruma, inokulum kaynağı olabilecek bulaşık bitkilerin tarım alanlarından uzaklaştırılması, virüs vektörleri (böcek, nematod, fungus vs.) ile mücadele edilmesi ve virüslere dayanıklı bitkilerin geliştirilmesi (Klasik ıslah ve moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak) gelmektedir. Bununla birlikte, özellikle virüs vektörleriyle kimyasal mücadelede kullanılan insektisitlerin çevre ve insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri ve bu kimyasallara karşı dayanıklı vektör ırklarının ortaya çıkması, virüslerden arı bitkilerin ise arazi koşullarında meydana gelen enfeksiyonlara karşı dayanıklılık göstermemesi araştırmacıları son yıllarda moleküler biyoloji tabanlı tekniklerle virüslere ve vektörlere dayanıklı bitkilerin elde edilmesine yönlendirmiştir (Yeşil ve Ertunç, 2012).

Kimyasal mücadelesinin henüz olmaması ve biber yetiştiriciliğini önemli ölçüde kısıtlayan polerovirüslere karşı dayanıklı materyal kaynakların araştırılması büyük önem arz etmektedir. Çalışmada kullanılan biber genotiplerine bulaşık biber bitkilerinden

yaprak biti ile polerovirüs taşınarak biber genotiplerinde oluşturdu tepkiler incelenmiştir. Polerovirüslerin oluşturduğu infeksiyonlara göre biber tiplerinden alınan örneklerde *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV)'ye karşı tepkileri DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immunesorbent Assay) yöntemine göre analiz ederek dayanıklı veya tolerant hatların olup olmadığı araştırılmıştır. Bu çalışma da amaç bazı biber genotiplerinde kontrollü koşullar altında ve arazi şartlarında polerovirüslere dayanıklılık durumu belirlenecek olup ıslah çalışmalarında kullanılabilecek dayanıklı materyallerin tespit edilmesi çalışmanın temel amacıdır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Türkiye’de baharatlık biber üretiminin büyük bir kısmı Kahramanmaraş, Gaziantep, Şanlıurfa, Diyarbakır, Adıyaman ve Hatay illerinden karşılanmaktadır. Biber meyveleri taze olarak tüketilirken, yaygın olarak ülkemizin güney bölgelerinde toz biber veya salça olarak da işlenmektedir. Bu bölgelerin büyük bir bölümünde yetiştiricilik, lokal popülasyonlardan alınan tohumlarla yapılmaktadır. Tohumda yüksek oranda açılım olduğundan, ana bitkiden gelen özelliklerde değişim meydana gelmekte ve biber meyvesinin kalite özelliklerinde önemli ölçüde kayıplar olmaktadır. Bu amaçla, sözü edilen yörelerdeki üniversiteler ve bölge araştırma enstitüleri üstün özelliklere sahip yeni hatlar ve hibrid çeşitler elde etmek amacıyla ıslah programları uygulamaya başlamıştır (Akıncı ve Akıncı, 1999).

Biber yetiştiriciliğinde ekonomik anlamda kalite ve kantite parametrelerinin düşmesinde viral kaynaklı etmenlerin etkisi büyüktür. Türkiye’de açık alanlarda biber tarımının yapıldığı birçok yörede virüs enfeksiyonları tespit edilmiştir. Virüslere karşı doğrudan kimyasal mücadelenin mevcut olmaması, diğer kontrol yöntemlerinin üreticiler tarafından yeterli düzeyde bilinmemesi ve virüs epidemiyolojisi ülkemizde yeterli çalışmanın yapılmamış olması virüs zararlarından kaynaklanan kayıpların her geçen gün artmasına neden olmaktadır.

Biberlerde viral ajanların neden olduğu ilk hastalık teşhis çalışmaları yakın zamanda başlamış ve Mathews (1992), son yıllarda yoğunlaşan çalışmalar sonucunda biber bitkisine hastalık yapan 17 virüs grubu ve bu gruplarda 37 virüs olduğunu belirtmiştir.

Polerovirus cinsi *Luteoviridae* familyası üye olan *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) ilk kez 1982'de Fransa'da bildirilmiştir. Virüsün özellikle yaşlı yapraklarda sararma ve koyulaşmaya neden olduğu, virüsün erken enfeksiyon oluşturduğu kavun ve hıyarda % 40-50 verim kayıplarına neden olduğu belirtilmiştir. Polerovirüslerin spesifik yaprak biti vektörleri ile sirkülatif nonpropagatif bir şekilde taşındığı ancak mekanik olarak taşınmadığı bildirilmiştir. CABYV'nin *Myzus persicae* ve *Aphis gossypii* tarafından sıklıkla diğer kabakgil türlerine taşındığı bildirilmiştir (Lecoq ve ark, 1992).

Tayvan'da CABYV ilk kez 1997'de kavun üzerinde bulunmuş ve 1997-2007 yılları arasında yapılan çalışmalarda kabakgil bitkilerinde yaygın olarak tespit edilmiştir (Deng ve ark., 2007).

Polerovirüs partikülleri, yaklaşık 25 nm'lik bir isohedral simetriye ve 5,7 kb'lik tek iplikli (ss) pozitif RNA molekülüne sahiptir. Genom altı açık okuma çerçevesinde (ORF'ler) organize edilir. Yaklaşık 200 nt'lik bir kodlamayan intergenik bölge (IR), ORF3'ten (kılıf proteini, CP) ORF2'yi (muhtemel RNA'ya bağımlı RNA polimeraz, RdRp) ayırmaktadır. (D'Arcy ve Domier, 2005).

Biberde zararlı olan 42 adet virüsün yaptığı yıllık zarar %42-%80 dolayındadır. Bu virüsler arasında *Hıyar mozaik virüsü* (CMV), *Patates Y virüsü* (PVY), Biber çizgili damar virüsü (PVBV), *Tütün mozaik virüsü* (TMV) en önemli virüslerdir (Palloix, 1994; Ekbiç ve ark., 1997).

Arlı-Sökmen ve ark. (2005) Samsun'da topladıkları toplam 313 biber örneğinde DAS-ELISA ile %15,4'ünde TMV+PVY karışık enfeksiyonunu tanılamıştır. AMV, biber ekili alanlarda ilk kez bu çalışmada rapor edilmiştir. Yaklaşık 15 familyaya ait 24 yabancı ot türünün 16 tanesinde en az bir virüs enfeksiyonu belirlenmiştir. *Amaranthus retroflexus*, (CMV, PVY, ToMV, TMV ve TSWV'nün ortak konukçusu olarak belirlenirken, *Hibiscus trionum*, PVY ve TSWV için yeni bir konukçu olarak rapor edilmiştir.

Buzkan ve ark. (2006), Güneydoğu (Şanlıurfa, Gaziantep) ve Doğu Akdeniz (Kahramanmaraş, Hatay) bölgelerinde biberde yaprakbitleriyle taşınan virüslerin bazılarının yayılımlarını tespit etmek amacıyla toplanan örnekleri DAS-ELISA ile CMV, AMV, PVX, PVY, PMMoV ve TEV için testlemiştir. Örneklerin %64,8'inin bir veya daha fazla virüsle enfekteli olduğunu belirlemiştir. PVY biberde en yaygın virus olarak bulunurken bunu PVX, AMV, TEV, PMMoV ve CMV enfeksiyonları takip etmiştir. PMMoV örnek alınan bütün bölgelerde ilk kez tespit edilmiştir. Aynı araştırmacının Kahramanmaraş'ta yetiştirilen biberlerde tohumla taşınan virüslerin PCR ile tanılanmasına yönelik araştırma yapmış ve çok az oranda tohumda CMV tespit

edilmiştir (Buzkan ve ark., 2009). Yörede virüslerin tohumla taşınma oranının önemli olmayacak seviyelerde olduğunu söylemek mümkündür.

Buzkan ve ark. (2013) Hatay'dan alınan örneklerde PYLCV ve BWYV'ün karışık enfeksiyonunu tanımlanmışlardır. Her iki virüs *Luteoviridae* familyasında *Polerovirus* cinsinde yer almaktadır. Polerovirus cinsinde yer alan virüsler (+) yönde, linear, tek sarmal RNA ve altı ORF'ye sahiptirler. Partikülleri izometrik şekilli, 25-30 nm büyüklüğündedir. Viral nükleik asit 5600-5882 nt'den meydana gelmiştir. *Luteoviridae* familyasındaki bütün virüsler floemde sınırlıdır ve yaprakbitleriyle (*Myzus persicae*, *Aphis gossypii*) sirkülatif (propagatif olmayan) perzistent olarak taşınırlar (Beuve ve ark. 2007; Dombrovsky ve ark., 2010).

Luteoviridae familyasında üye olan grupların mekanik olarak, bitki özsuyunun konukçu indikatör bitkilere taşınması mümkün olmadığını bildirmiştir. (Waterhouse ve ark.,1988).

Polerovirüslerin serolojik tanımlanmasında, virüslerin poliklonal antiserumları arasında çok yakın ilişki bulunmaktadır (Duffus ve Russell, 1970; Hauser ve ark., 2000). Bazı virologlara göre BMYV, BWYV'ün ırkı olarak kabul edilmektedir. Son 10 yılda her iki virüsü birbirinden ayırd etmek için yapılan çalışmalarda, BMYV'nün birçok Avrupa orijinli yabancı otları enfektelediğini, ancak konukçu dizisinin BWYV'nün Avrupa izolatından daha dar olduğu vurgulanmıştır (Stevens ve ark. 1994; Graichen ve Rabenstein, 1996).

Luteoviridae familyasına dahil Polerovirüs cinsinin şekerpancarında hastalık yapan üç üyesi mevcuttur. Şekerpancarı hafif sarılık virüsü (*Beet mild yellowing virus*=BMYV), Şeker pancarı kloroz virüsü (*Beet chlorosis virüs*=BChV) ve Şeker pancarı batı sarılık virüsü (*Beet western yellows virus*-USA=BWYV-USA) dır. Kısmen Avrupa'da bulunan ve şeker pancarını hastalandırmayan BWYV izolatı henüz Şalgam sarılık virüsü (*Turnip yellows virüs*=TuYV). olarak adlandırılmamıştır. Etmenle bulaşık şeker pancarının yaşlı yaprakları bulaşmadan sonraki 4-6 hafta içerisinde saramaya başlar. Daha sonra tamamen sararır ve kalınlaşır. Birçok yaprak biti türü ile persistent olarak

taşıyan polerovirüslerin en önemli vektörü şeftali yaprak biti (*Myzus persicae*) dir (Stevens ve ark. 2005).

Stevens ve ark. (1994), şekerpancarından topladıkları BMV izolatları arasındaki çeşitlilikleri monoklonal antibadilerle test ederek indikatör bitkilere taşınımını karşılaştırmışlardır. Yaygın BWYV izolatlarının monoklonal antibadilerle reaksiyona girdiğini ve çoban çantası bitkilerini hastalandırdığını BMV izolatının antibadilerle reaksiyona girmediğini ve çoban çantası bitkilerini hastalandırmadıklarını bildirmiştir.

Wilson ve ark. (2012) Tasmanya'da ekonomik öneme sahip brokkoli, karnabahar, fasulye ve bezelye ürünlerini *Potyvirüsler*, *Luteoviridae* familyasına dahil virüsler ve AMV, CMV, SCSV (*Subterranean clover stunt virüs*) TSWV ve Karnabahar mozaik virüsüne karşı test etmişlerdir. Her ürün için muhtemel virüsleri test ettikleri çalışmalarını 2007-2010 yılları arasında gerçekleştirmişlerdir. Havuçta virüse rastlamazlarken Bezelye ve brokkoli Luteoviridae familyasına dahil virüslerin en fazla görüldüğü türler olmuşlardır. Potyviruslerden bezelyede PSbMV (*Pea seed-borne mosaic virüs*) ilk yıl görülmüş tohumların yenilenmesi ile sonraki yıllarda bu virüse rastlanmamıştır. Luteovirüs izolatlarının ise Şalgam sarılık virüsü (*Turnip yellows virüs*) olduğu belirlenmiş ve izolatların CABYV ile benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir.

Xiang ve ark. (2008) CABYV Çin izolatının RNA genomunu tamamını dizilemişler ve MABYV (Melon aphid-borne yellows virüs) virüsünü ilk defa belirlemişlerdir. CABYV-CHN izolatının % 89.0 oranında Fransız CABYV izolatı ile benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir. MABYV ile CABYV ve diğer polerovirüsler arasında ise % 50.7–74.2 arasında değişen oranlarda benzerlikler bulmuşlardır. Farklı gen bölgelerinin oluşturdukları aminoasit dizilemlerinin benzerliklerinin ise % 24.8 ile % 82.9 arasında değiştiğini belirten araştırmacılar MABYV'i polerovirüs cinsinin yeni bir üyesi olarak duyurmuşlardır.

Shang ve ark. (2009) *Cucurbit aphid-borne yellows virüs*(CABYV) ve *Melon aphid-borne yellows virüs* (MABYV)ünün kabakgillerde sararmalara neden olduğunu

bildirmişlerdir. Rekombinasyon analizinin MABYV'in rekombinant bir virüs olabileceği doğrultusunda sonuç verdiğini belirlemişlerdir.

Yaprak malformasyonu ve lekelenme gösteren bir Çin lahanası bitkisinin RNA'sı (*Brassica campestris ssp. Pekinensis*) etiketlenmiş, bitki virüslerini ve viroidlerini saptayabilen bir DNA çipi hibridize edilmiştir. *Beet mild yellowing virus* (BMV) ve *Beet western yellows virus* (BWV) için spesifik problemlerin pozitif sonuçlar vermiş BMV, BWV, *Beet chlorosis virus* (BCV) ve *Turnip yellows virus* (TuV) de dahil olmak üzere çeşitli polerovirüslerle % 90 veya daha fazla benzerlik göstermiştir. (Lim ve ark., 2015).

Hindistan, Endonezya, Mali, Filipinler, Tayland ve Tayvan'daki tarlalardan toplanan 29 biber ve köpek üzümü örneğinde ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile Polerovirüs enfeksiyonu belirlenmiştir. Kısmi genom dizilerinin sekans analizi ile 13 biber örneğinde *Pepper vein yellows virus* (PeV) saptamışlardır (Knierim ve ark., 2013).

Xiang ve ark., (2008) 2006 yılında Çin'de yaptığı survey çalışmalarında şeker pancarı üretim alanlarının %5-%30 arasında değişen oranlarda sarılık semptomları gözlemlemişlerdir. Yaşlı ve orta yaşlı yaprakların damar aralarında gözlemledikleri sarıların daha önce Hauser ve ark. (2000) ve Stevens ve ark., (2005) tarafından diğer ülkelerde rapor edilen polerovirüs (*Beet western yellows virus*, BWV; *Beet mild yellowing virus*, BMV; *Beet chlorosis virus*, BCV) semptomları ile benzerlikler gösterdiğini ifade etmişlerdir. Marullardan topladıkları izolatların da BWV olduğunu belirleyen araştırmacılar marul izolatlarının %88-98 oranında şekerpancarından izole edilen izolatlarla benzerlik gösterdiklerini belirlemişlerdir.

Brassica yellows virus, Luteoviridae ailesi içinde Polerovirüs cinsinde yeni tanımlanan bir türdür. *Brassica yellow virus* (BrV), Çin Halk Cumhuriyeti ve Güney Kore genelinde yaygın olarak bulunur ve lahanagilleri etkileyen önemli bir virüstür. (Zhang ve ark., 2014)

Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV), dünya genelinde baklagil bitkilerde sararma belirtilerine neden olur. İran ve Slovakya'dan CABYV izolatları için kılıf proteini (CP) geni sekansları ilk kez bildirilmektedir. CABYV izolatlarının sekans benzerliğinin virüsün epidemik yaygınlığını yansıttığını ve virüsün konukçu ve vektörel böcek miktarına bağlı olarak dünya genelinde hızla yayıldığını bildirmişlerdir. (Bananej ve ark, 2009)

Marul yetiştiriciliği yapılan bölgelerde ciddi kayıplara neden olan Luteovirus grubunun bir üyesi olan Pancar Batı Sarılık Virüs (BWYV), birçok Marul çeşitlerinde (*Lactuca sativa* L.) veya *L. serriola* L. ve *L. saligna* L.'de BWYV'ye karşı tam direnç tespit edilememiştir. Maisonneuve ve ark., (1991) *L. virosa*'nın test edilen üç hattından biri olan IVT 280, BWYV'ye aşırı dirençli olduğu görülmüştür. Bu direncin kalıtım derecesi duyarlı *L. virosa* IVT 1398 ile yapılan karşılaştırması sonucunda dominant bir direnç genin varlığını doğrulamış olup bu gen için Bw sembolü önermişlerdir. (Maisonneuve ve ark., 1991)

Walkey ve Pink, (1990) yaptığı çalışmada ticari ve diğer bazı marul türlerinde *Beet Western Yellow Virüs* (BWYV)' ne tarla ve sera koşullarında dayanıklılığın belirlemesi için 1985, 1986 ve 1987 yıllarında yapılan tarla deneylerinde marul çeşitlerinin BWYV'ye reaksiyonlarında farklılık gösterdiğini ancak ana ticari türlerde dayanıklılığın tespit edilmediğini Batavian tipi çeşitlerde, *Lactuca perennis* ve *L. muralis*'de aşırı direnç olduğunu belirlemişlerdir. BWYV bazı marul çeşitlerinde % 63 verim kaybına neden olduğunu, bazı marul çeşitlerinde ise %38 oranında olgunlaşmayı geciktirdiğini belirlenmişlerdir.

Dogimont ve ark., (1997) Fransada Kavun'da (*Cucumis melo* L). *Cucurbit aphid-borne yellows luteovirus* (CABYV) dayanıklılığı kalıtımını belirlemek için dayanıklı bir Hint hattı olan PI 124112 ile Charentais tipi duyarlı bir çeşit Vedranta's arasındaki melezlerden elde edilen üç generasyonu incelemişlerdir. F₂ döller ve rekombinant yakın döller doğal enfeksiyon koşulları altında açık alanda ve kontrollü koşullardaki *Myzus persica* yaprak biti tarafından taşıyarak bitkilerdeki virüs çoğalmasının ELISA ile belirlemişlerdir. PI 124112'deki CABYV dayanıklılığının iki bağımsız tamamlayıcı

resisif gen tarafından sağlandığını belirlenmişlerdir. Bu genlere cab-1 ve cab-2 sembollerini vermişlerdir.

TuYV % 26-46 ya kadar verim kaybına neden olur. Ilıman sonbahar ve kış koşulları yaprak bitlerinin gelişmesi ve yayılmasında etkilidir. Potansiyel dayanıklılık genlerinin tanımlanması ve kullanılması bu önemli viral hastalığı kontrol etmek için alternatif bir strateji sağlamaktadır. Son çalışmalarda TuYV'ya dayanıklılıkta kullanılabilecek potansiyel bir dayanıklılık geninin tespit edildiğini bildirmişlerdir (Stevens ve ark., 2008).

Barley yellow dwarf virus-PAV (BYDV-PAV) ve *Cereal yellow dwarf virus-RPV* (CYDV-RPV)'lerine dayanıklılık ve duyarlılığın ölçülmesi için yapılan bir çalışmada spesifik primerler kullanılarak yellow dwarf disease (YDV) hastalığının tanımlanmasında kullanılma potansiyeline sahip olduğunu belirlenmiştir (Balaji ve ark., 2003).

Potato leafroll virus (PLRV) en yaygın virüslerden biri olup Patateste önemli bir virüs hastalığıdır. Virüs çoğalmasına karşı dayanıklılık çalışmaları 2 adet QTL bölgesi belirlenmiştir. Onbirinci ve 5 ile 6. Kromozomlarda yer aldığını düşündükleri bu genler için SCAR markırlarını geliştirerek dayanıklılığın belirlenmesi amacı ile kullanılabileceklerini bildirmişlerdir (Marczewski ve ark 2001).

Luteovirüs grubunun bir üyesi olan potato leafroll virüs (PLRV) kılıf proteini geni, patatese aktarılmıştır. Transgenik bitkilerde PLRV multiplikasyonu düşük bulunmuştur. Bu genin PLRV'nin kontrolü için pratik ve aynı zamanda virüs bulaşmasının mekanizmalarını anlamaya yardımcı olabileceği vurgulanmıştır (Kawchuk ve ark., 1990).

Chickpea chlorotic dwarf virus (CpCDV) dünya genelinde nohut ürünlerini etkileyen en önemli biyotik hastalık etmenidir. CpCDV yerli ve ticari çeşitlerde şiddetli belirtilere neden olmaktadır. Transgenik nohut genotiplerinin CpCDV inokülasyonuna verdikleri tepkileri değerlendirmek için farklı semptomlara kantitatif değer veren objektif bir puanlama sistemi geliştirilmiştir. İnokülasyon ve skorlama teknikleriyle 70 nohut

genotipi taranmış virüs dayanıklılığında çok vektör ile beslemeye dayanıklılığın virüsle mücadelede önemli olduğunu bildirmişlerdir (Kanakala ve ark., 2013).

Avrupa'da kış döneminde artan sıcaklıkla birlikte mısır yetiştiriciliğinde belirgin bir sorun haline gele *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) dayanıklılık kaynaklarının belirlenmesi için geniş bir germplazm setinde BYDV direncine göre genetik çeşitliliğin saptanması ve BYDV direncinde yer alan genlerle bağlantılı tek nükleotid polimorfizm (SNP) belirteçlerini tanımlamak için yapılan çalışmada bitkiler, *Rhopalosiphum padi* yaprak biti kullanılarak BYDV PAV ile inoküle edilmiştir. Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) ve enfeksiyon oranına göre seçilen popülasyonlarda haritalama yapılmış BYDV direnci ile önemli derecede ilişkili olan SNP'lerin marker destekli seçimde kullanılabilmesini ve BYDV dirençli mısır genotiplerinin geliştirilmesi sürecini hızlandırabileceğini belirlemişlerdir (Horn ve ark., 2014).

Barley yellow dwarf luteovirus (BYDV), tüm dünyadaki tahıllarda ciddi verim kayıplarına neden olur. Etiyopya orijinli arpalardan (*Hordeum vulgare* L.) gelen Yd2 geni, BYDV'ye karşı direnç sağlamanın en etkili yöntemidir. Yd2 bölgesinin detaylı bir bağlantı haritasının oluşturulması sonucunda genin XYIp lokusunda meydana getirdiği protein ürünün, BYDV'ye dayanıklılık sağladığını belirlemişlerdir (Collins ve ark., 1996).

Biber bitkilerinde zarar yapan hastalık ve zararlılar içerisinde virüsler, kimyasal mücadelelerinin olmaması, tohum, aşı ve vektörlerle taşınmalarından dolayı önemli bir yere sahiptirler (Palloix, 1994; Ekbiç ve ark., 1997). Bitki virüsleri, dünyada tarımsal ürünlerde hastalık yapan patojenlerin önemli bir grubunu oluşturmaktadır. Bitki virüs hastalıkları birim alandan sağlanan verimi düşürmek ve kaliteyi bozmak suretiyle önemli boyutlarda ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu ekonomik kayıpların önüne geçme çabaları yıllardan bu yana insanlığın uğraşı alanını oluşturmuştur (Çandar ve Erkan, 2011).

Virüs izolatlarının teşhisi ve dayanıklılık mekanizmasını yıkma kapasitelerini ortaya koyan çalışmalar, ekonomik olarak önemli ürünlerin sertifikasyon programları ve ileriye dönük dayanıklı varyetelerin elde edilmesi, kullanılmasını sağlamaları bakımından önemlidir. Ancak spesifik monoklonal antibadiler kullanılarak yapılan ELISA testi çalışmaları her iki virüsün ırklarının teşhisinde güvenilir sonuçlar vermemektedir. RT-PCR bu amaçla kullanılabilir en güçlü alternatif yöntem olarak kabul edilmektedir (Singh, 1998; Weilguny ve Lorenzen ve ark., 2006). BWYV'nün biberdeki ırklarına yönelik çalışma bulunmazken, PYLCV'nün ırklarının teşhisinde daha spesifik olmaya yönelik çalışmalar devam etmekte olup, virüs genomunun farklı bölgelerinden spesifik primerler hazırlanmaktadır.

Ben Khalifa ve ark. (2009) Hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık sağlayan genlerin kontrolü morfolojik markırların yanında moleküler markırlar da ıslah çalışmalarında önemli bir yer tutmayı başarmıştır. Özellikle Son dönemlerde biberde sürekli görülen virüslere karşı dayanıklılık çalışmalarında markır destekli seleksiyon (MAS) amaçlı çalışmalar artış göstermektedir.

İbلاغی ve ark. (2006) Bazı gen çiftlerinin hibridizasyonu sonucu patojen virüse karşı konukçu bitkiyi sırasıyla bağışık kıldığı, enfeksiyona dayanıklı hale getirdiği, konukçu da duyarlılık gerçekleştirerek, enfeksiyondan koruduğu yine genotipik değişiklikler yaratarak, patojen virüsün enfeksiyonuna karşı konukçu bitkide tolerans sağladığı, hatta virüsün vektörlerine karşı dayanıklılık oluşturduğu durumlar olduğunu bildirmiştir.

3. MATERYAL ve METOT

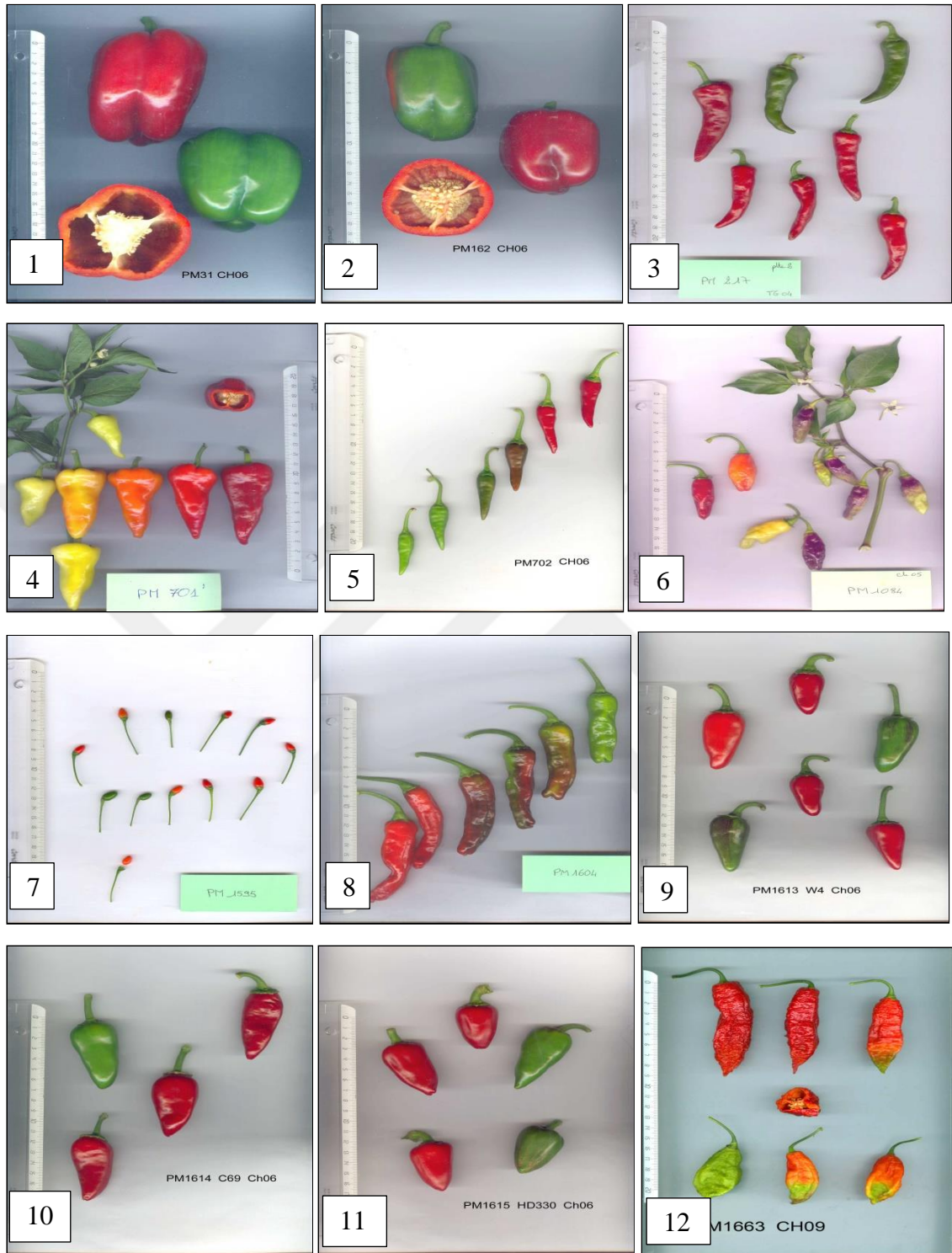
3.1. Materyal

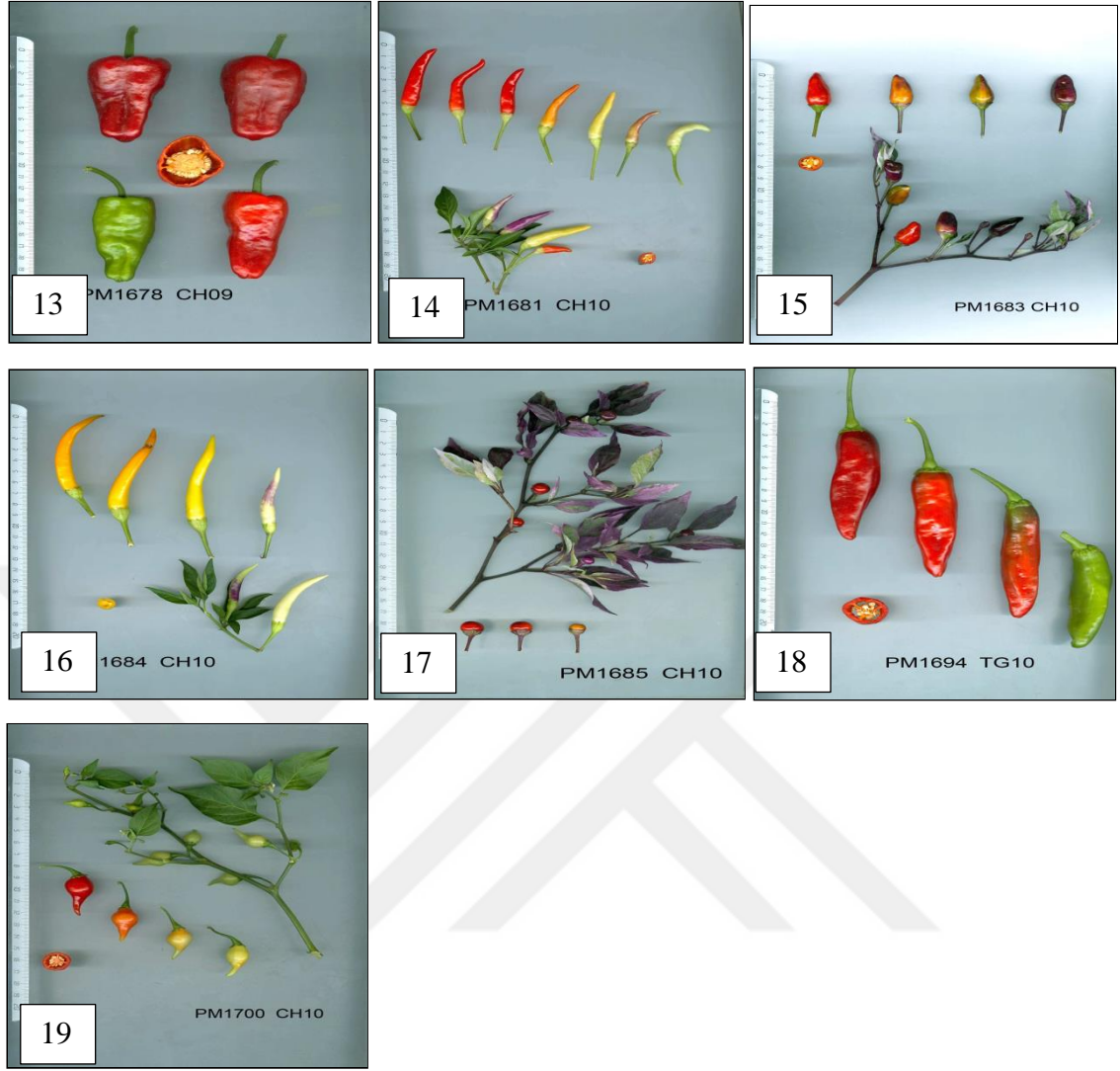
3.1.1. Bitkisel Materyal

Çalışmada kullanılan biber genotipleri Çizelge 1.'de verilmiştir. PM hatları olarak kodlanan genotipler INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) Fransa Ulusal Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden elde edilmiştir.

Çizelge 1. Çalışmada materyal olarak kullanılan genotipler

Sıra No	Genotip	Sıra No	Genotip
1	PM 31=YOLO WONDER	17	PM 1685=PURPLE FLASH
2	PM 162 =YOLO Y	18	PM 1694=MAYFOUQ
3	PM 217=PI201234 PIMENT 493-1	19	PM 1700=BIQUINHO
4	PM 701=L 29-6	20	PM 1179=SHATA
5	PM 702=CRIOLLO DE MORELOS 334	21	PM 1088=BOJONEGRO N1125
6	PM 1084=PI152225	22	PM: 1079=NU MEX CONQUISTADOR
7	PM 1595=TOTOLAPA	23	PM: 1050=BOUSSO 10
8	PM 1604=ISHII MIDORI	24	PM: 815=ER FU TOU
9	PM 1613=W4 HD(YOLO WONDER x CM334)4	25	PM: 611=MULATO ROQUE
10	PM 1614=C69 HD(CM334 x Yw)69	26	PM: 448=VINETTE
11	PM 1615=HD330 HD(PM217 x YW)30	27	PM 1687=ANDRATX
12	PM 1663=BHUT JOLOKIA	28	Elbeyli Hattı
13	PM 1678=PADRON	29	Şahibey Çeşidi
14	PM 1681=SANGRIA	30	Yeniyapan Hattı
15	PM 1683=CALICO Ornamental		
16	PM 1684=SANTOS FLAMME		





Şekil 1. Çalışmada materyal olarak kullanılacak genotipler (INRA koleksiyonundan alınmıştır). (Çizelge 3.1'deki sıralamaya göre verilmiştir)

3.1.2 Polerovirüslerin Biber Bitkilerine Taşınmasında Kullanılan Yaprak Bitleri

Polerovirüsler ile bulaşık olan bitkilerden çalışmada materyal olarak kullanılan biber bitkilerine virüslerin taşınmasında *Myzus persicae* ve *Aphis nerii* yaprak biti türleri kullanılmıştır.

3.1.3. Serolojik Çalışmalarda Kullanılan Materyal

ELISA testlerinde, Çizelge 3.1’de belirtilen biber genotiplerine RT-PCR ve sekans analizi sonucu PVYV ile infekteli olduğu belirlenen örneklerden alınan bitki yaprakları ve meyveler materyal olarak kullanılmıştır. DAS-ELISA testi için kullanılan Cucurbit aphid-borne yellow virüs (CABYV) SEDIAG firmasından ticari olarak temin edilmiştir. ELISA testlerinde; ELISA kiti, tampon çözeltiler, düz tabanlı 96 kuyu içeren Maxi Sorpmikrotiter ELISA plateleri (NUNC-Danimarka), Thermo marka GoScan spektrofotometre, otomatik pipetler, pipet uçları ve saf su kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Çalışmada Kullanılan Biber Genotiplerinin Yetiştirilmesi

Çalışmada kullanılan biber bitkilerin tohumlarının ekimi ve fidelerin yetiştirilmesi için, 1:1:1 oranında karıştırılan kum, toprak ve torf karışımı, plastik saksılar, plastik küvetler kullanılmıştır. Gerekli görüldüğü zaman mikro ve makro besin elementleri içeren gübreler uygulanmıştır.

Toplam 30 genotipe ait tohumlar saksılara ekilerek kontrollü koşullarda en az 5 adet bitki olacak şekilde yetiştirilmiştir. Bitkiler fide döneminde arazi ye şaşırtılmıştır. Daha sonra biber bitkilerinin gelişimleri izlenmiştir.

3.2.2 Yaprak Bitleri İle Polerovirüslerin Taşınma Çalışmaları

Çalışmada polerovirüsle bulaşık olan biber bitkileri üzerinde *Myzus persicae* ve *Aphis nerii* yaprak bitleri 2 gün süreyle beslenmek üzere bırakılmıştır. (Şekil 2)



Şekil 2. Polerovirüsle bulaşık biberlerde yaprak bitlerinin beslenmesi

Beslenme süresi sonunda çalışmada materyal olarak kullanılan biber bitkileri üzerine yaprak bitleri beslenmek üzere bırakılmıştır. (Şekil 3)





Şekil 3. Polerovirüslü biber üzerinde beslenen yaprak bitlerinin çalışmada kullanılan biber çeşitleri üzerine aktarılması.

3.2.3. Açık Alanda Polerovirüslere Dayanıklılığın Belirlenmesi Çalışmaları

Mayıs - Eylül aylarında arazi koşullarında Çizelge 1’de belirtilen biber genotiplerin dikimi yapılmıştır. Polerovirüslerle bulaşık olan bitkilerden arazi koşullarda doğal olarak taşınması incelenmiştir. Arazi koşullarında polerovirüsler ile bulaşık olduğundan şüphelenilen bitkilerin belirlenmesi amacıyla, öncelikle simptomatolojik gözlemler yapılmıştır. Örnek alınan bitkilerde polerovirüslerin sebep olabileceği nekroz, bodurluk, boğum aralarında kısılma, yapraklarda kıvrılma ve leke, damar açılması, sarılık, nekrotik lekeler ve klorotik leke belirtileri aranmıştır. Virüslerin meydana getirebileceği simptomlardan bir veya birkaçını gösteren biber bitkilerinden alınan örnekler, örnek poşetlerine numaralandırılarak konulmuş ve buz kutusu içinde laboratuvara getirilmiştir. Simptomatolojik gözlemler sırasında, virüs simptomu göstermeyen ancak, simptomun gizlenebileceğinden şüphelenilen biber bitki örnekleri de aynı şekilde laboratuvara getirilmiştir. Bu bitki dokuları, yapılacak olan serolojik çalışmalarda kullanılmak üzere kısa bir süre için buzdolabında +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.4. Serolojik Çalışmalar

Arazi çalışmalarında simptomatolojik olarak virüs ile bulaşık olduğundan şüphelenilen biber bitkisi örneklerinde, CABYV’nün varlığı DoubleAntibodySandwich (DAS) ELISA testi ile araştırılmıştır.

ELISA testlerinde kullanılan tampon çözeltiler ve hazırlanması Ek 1’de verilmiştir. ELISA testleri sonucunda, sağlıklı kontrol için 405 nm’de elde edilen absorbans değerinin en az iki katı veya daha fazla absorbans değeri veren örnekler şüpheli olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4.1. DAS-ELISA Testi

DAS-ELISA testi çalışmaları, Clark ve Adams (1977) tarafından bildirilen yöntemle göre ve firmanın bildirdiği protokol dikkate alınarak modifiye edilerek uygulanmıştır. Çalışmada kullanılan sulandırma oranları, kitin temin edildiği firmanın belirttiği oranlar dikkate alınarak yapılmıştır. DAS-ELISA yöntemi aşağıda belirtilen şekilde uygulanmıştır.

1. Virüsler için spesifik γ -globulin, firmanın belirttiği yöntemle göre, kaplama tamponu ile kullanılacak optimum konsantrasyona göre sulandırılarak (1/200 sulandırma) ELISA platelerinin her bir çukuruna 100 μ l konulmuş ve platelerin üzeri kapatılarak oda sıcaklığında 4 saat inkübe edilmiştir.
2. İnkübasyondan sonra yıkama tamponu ile tüm çukurlar üç kez yıkanmıştır. Yıkama tamponu üç dakika süreyle çukurlarda bekletilmiş ve ters çevrilerek plate boşaltılmıştır.
3. Alt alta gelecek şekilde her çift çukura, 100 μ l örnek tamponu ile hazırlanmış örnekler, düzenlenmiş plana göre konmuş ve plate’in üzeri kapatılıp +4 °C de bir gece boyunca inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyondan sonra, platelerin tüm çukurları yıkama tamponu ile üç kez yıkanmıştır. Yıkama tamponu, üç dakika süreyle çukurlarda bekletilmiş ve ters çevrilerek plate boşaltılmıştır.
5. Konjugat tamponu içerisinde sulandırılmış olan enzimle işaretli γ globulinden (Konjugate) platedeki her kuyuya, 100’er μ l konulmuş ve oda sıcaklığında 4 saat inkübasyona bırakılmıştır.
6. İnkübasyondan sonra, yıkama tamponu ile tüm çukurlar üç kez yıkanmıştır. Yıkama tamponu üç dakika süreyle çukurlarda bekletilmiş ve ters çevrilerek plate boşaltılmış ve kağıt havlu üzerine vurarak kuruması sağlanmıştır.

7. Substrat tamponunda taze olarak hazırlanmış substrattan (1mg/ml p-nitrophenyl phosphate) her bir çukura 100 µl konmuş ve 30-60 dk veya gerekli görüldüğünde daha uzun süre oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir.

8. Ölçümler THERMO GOScan spektrofotometre ile 405 nm dalga boyunda yapılmıştır.

Arazi çalışmalarında virüsle bulaşık olduğu simptomatolojik olarak şüphelenilen örnekler yapılan ELISA testleri sonunda; ELISA okuyucusunda negatif kontrol için, 405 nm de elde edilen absorbans değerinin en az iki katı ve daha fazla absorbans değeri veren örnekler pozitif olarak kabul değerlendirilmiştir.

3.2.5. Viral RNA İzolasyonu

Yaprak ve meyve örneklerinden Tri-Reagent kit (Molecular Research Center Inc.) kullanılarak aşağıdaki adımlarla toplam nükleik asit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyonda kullanılan tampon çözeltilerinin içerikleri ve hazırlanma yöntemleri Ek 1' de yer almaktadır.

- Yaprak ve meyve örnekleri (500 mg), 2 ml ezme tamponu (Ek 1) içerisinde homojenizatör kullanılarak ezilip, kullanılıncaya kadar +4°C'de saklanmıştır.
- Ezilen örneklerden 300 µl alınıp üzerine 500 µl Trizol (TR-118) veya Tri Reagent eklenmiştir.
- Vortekslenen örnekler oda sıcaklığında 10 dak bekletilmiştir.
- Örnekler üzerine 200 µl kroloform eklenip vortekslenmiştir.
- 14.000 devir/dak'de 15 dakika santrifüj yapıp ayrıştırılan temiz sıvı kısım yeni tüplere aktarılmıştır.
- 300 µl izopropanol eklenen tüpler el ile çalkalanmıştır.
- Tüpler 10 dak oda sıcaklığında bekletildikten sonra 14.000 devir/dak'de 15 dak santrifüj edilmiştir.
- Sıvı kısım atıldıktan sonra her tüpe 1 ml %70 etanol eklenmiş ve 14.000 devir/dak'de santrifüj edilmiştir .
- Daha sonra sıvı kısım atılıp tüpler kurutulmuştur.
- Tüplere 50 µl saf su eklenip vortekslenerek -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.6. Tersine Transkripsiyon (Reverse Transcription, RT) ve Tamamlayıcı DNA (cDNA, complementary DNA) Sentezi

- RNA izolasyonu yapılan örnekler PCR aşamasından önce Moury ve ark., (2004)'nin bildirdiği protokol kullanılarak aşağıdaki adımlarla tamamlayıcı Tersine transkripsiyon ve DNA (cDNA, complementary DNA) işlemi uygulanmıştır. Reaksiyon için 2 µl Toplam nükleik asit (TNA) kullanılmıştır. Sentez Polerovirus reverse primer (1 µl/örnek) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Karışım sırasıyla 70°C'de ve buzda 5'er dakika bekletilmiştir.
- Karışıma 4 µl 5X tersine transkripsiyon tamponu , 0,8 µl 10 mM dNTP ve 0,5 µl M Maloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) Reverse Transcrpitase (20,000 U) enzim eklenmiştir. Reaksiyon karışımı 37°C'de 1 saat bekletilerek cDNA sentez tamamlanmıştır.

3.2.7. Polimeaz Zincir Reaksiyon (Polymerase chain reaction, PCR)

rTamamlayıcı DNA sentezlenen örneklerin çoğaltılması PCR yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Analizde PCR basamakları Moury ve ark., (2004)'nin bildirdiği protokol kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 2 µl Tag Buffer (10X), 1,2 µl MgCl (25 mM), 0,3 µl dNTP, 0,3 µl Taq polimeraz, 1 µl Pol Gr R ve Pol G- F primerlerinden oluşan tampon çözelti ve 2 µl cDNA'dan oluşan 20 µl'lik karışım ile PCR gerçekleştirilmiştir.

PCR sonrası elde edilen DNA ürünlerinin elektroforetik analizleri %1.5agaroz jel üzerinde 1X TAE (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA, pH 8.0) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel, etidium bromid boyamasından sonra UV transilluminator üzerinde gözlenmiş, jel fotoğrafları "GelDoc-It Imaging System" ile çekilmiştir.

3.2.8. Sekans Analizi

RT-PCR analizi sonucunda pozitif olarak saptanan örnekler METSANTEK (İstanbul TÜRKİYE) firmasına sekans analizine gönderilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Dünyada biberlerde polerovirüsler karşı dayanıklılık ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Biber genotiplerinde polerovirüslerin reaksiyonu bilinmemektedir. Bu çalışmada 30 biber hattının kontrollü sera koşullarında vektör aracılığı ile birlikte arazi koşullarında doğal olarak biber bitkilerine taşınmasıyla, biber bitkilerinde meydana getirdiği belirtiler incelenmiş olup polerovirüslere dayanıklı olabilecek materyal kaynağı araştırılmıştır.

4.1. Yaprak Bitleri İle Polerovirüslerin Taşınması Çalışmaları

PYLCV'nin biber bitkilerinde dayanıklılık genleri alleleleriyle olan ilişkileri YW ($pvr2^+$, duyarlı), YY ($pvr2^1$), W4 (Pvr4) ve Florida VR2 ($pvr2^2$) indikatör bitkileri üzerine, virüslerin vektör yaprakbitleriyle taşınmasıyla incelenmiştir. Virüs, referans bitkiler üzerinde hafif şiddetten daha şiddetliye doğru ilerleyen belirtiler meydana getirmiş, bitkilerde virüse karşı dayanıklılık özelliği gözlenmemiştir.



Şekil 4. Yolo Wonder (sol) ve YoloY (sağ) bitkilerine virüs taşıyan vektör yaprakbitleriyle polerovirüslerin taşınması ve yapraklarda PLYCV belirtileri

4.2 Açık Alanda Polerovirüslere Dayanıklılığın Belirlenmesi Çalışmaları

Çalışmanın ikinci yılında Mayıs - Eylül aylarında arazi koşullarında çizelge 3.1 de belirtilen biber çeşitlerine açık alanda deneme kurulmuştur. Arazi koşullarında

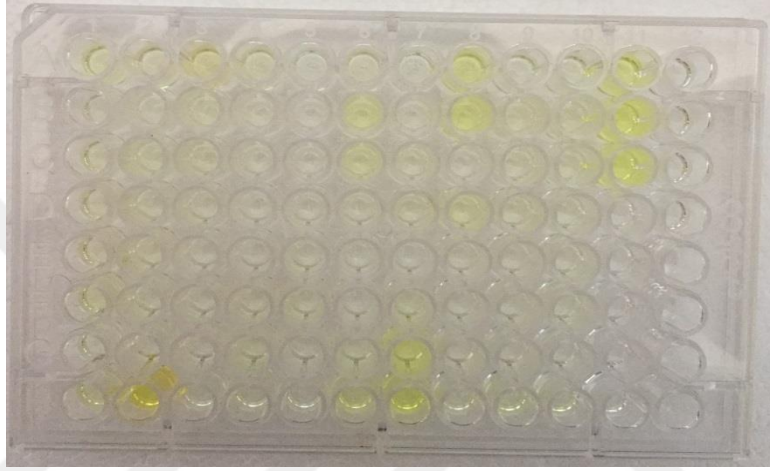
polerovirüslerin çizelge 3.1 yer alan biberlere doğal olarak taşınması sonucunda meydana getirdiği simptomatolojik gözlemler yapılmıştır. Bitkilerde virüslerin sebep olabileceği nekroz, bodurluk, boğum aralarında kısılma, yapraklarda kıvrılma ve leke, damar açılması, sarılık, nekrotik lekeler ve klorotik lekeler belirtileri aranmıştır. Polerovirüslerin meydana getirebileceği simptomlardan bir veya birkaçını gösteren biberlerler simptomolojik olarak takip edilmiştir. Biber bitkilerinde yaprakların geneline yayılmış sararma veya damar aralarına yayılmış sararma gösteren biber örneklerine ve simptom göstermeyen biber örneklerinede ELİSA testi yapılmıştır.



Şekil 5. Açık alanda polerovirüslerin biber bitkilerinde meydana getirdiği belirtiler

4.2. DAS-ELISA Testi Çalışmaları

Cucurbit aphid-borne yellow virüs (CABYV) spesifik antiserum kullanılarak, sarırlık, damar açılmamaları gibi belirtiler gösteren biber örneklerinin yapraklarından alınan örnekler DAS-ELISA testi yapılmıştır. Test sonucunda toplanan şüpheli 88 biber bitkisinden 6 tanesinde DAS-ELISA testi sonucunda 405nm de negatif değer en az iki katını veren örnekler pozitif kabul edilmiştir.



Şekil 6. Elisa testinde pozitif örneklerin görüntüsü

	Absorbans Değeri	Genotip	Absorbans Değeri	Genotip	Absorbans Değeri	Genotip	Absorbans Değeri	Genotip	Absorbans Değeri	Genotip
A	0,322	Elbeyli 1	0,190	Elbeyli 9	0,396	Yeniyapan 2	0,237	PM217	0,166	PM 1614
B	0,152	Elbeyli 2	0,174	Elbeyli 10	0,208	Yeniyapan 3	0,147	PM 701	0,129	PM 815
C	0,203	Elbeyli 3	0,204	Elbeyli 11	0,207	Yeniyapan 4	0,149	PM 702	0,351	Şahinbey
D	0,215	Elbeyli 4	0,189	Elbeyli 12	0,170	PM 448	0,127	PM 1084	0,156	PM 1614
E	0,185	Elbeyli 5	0,222	Elbeyli 13	0,143	PM 1179	0,112	PM 1054	0,119	PM 815
F	0,239	Elbeyli 6	0,190	Elbeyli 14	0,139	PM 1683	0,158	PM 1694	0,110	PM 1604
G	0,155	Elbeyli 7	0,160	Elbeyli 15	0,143	PM 1678	0,220	Hatay Biberi	0,175	PM 1615
H	0,310	Elbeyli 8	2,467	Yeniyapan 1	0,178	PM 1687	0,171	PM 1687	0,129	PM 1694
	Absorbans Değeri	Genotip	Absorbans Değeri	Genotip	Absorbans Değeri	Genotip	Absorbans Değeri	Negatif Kontrol	Absorbans Değeri	
A	0,106	PM 1681	0,165	PM 1681	0,129	PM 1681	0,171	PM 702	0,087	Tampon
B	0,163	PM 1694	0,143	PM 1694	0,124	PM 1700	0,143	PM 701	0,082	Tampon
C	0,152	PM 1678	0,095	PM 1694	0,166	PM 1678	0,112	PM 217	0,081	Tampon
D	0,165	PM 1615	0,335	F 35	0,191	V3	0,078	Negatif	0,075	Tampon
E	0,105	PM 1678	0,142	PM 1685	0,134	PM 1685	0,080	Negatif	0,072	Tampon
F	0,190	Americana	0,107	PM 31	0,156	PM 31	0,076	Negatif	0,075	Tampon
G	0,176	PM 1683	0,135	PM 162	0,149	PM 162	0,087	Negatif	0,098	Tampon
H	0,129	PM 1678	0,106	PM 1681	0,271	B8	0,091	Negatif	0,173	Tampon

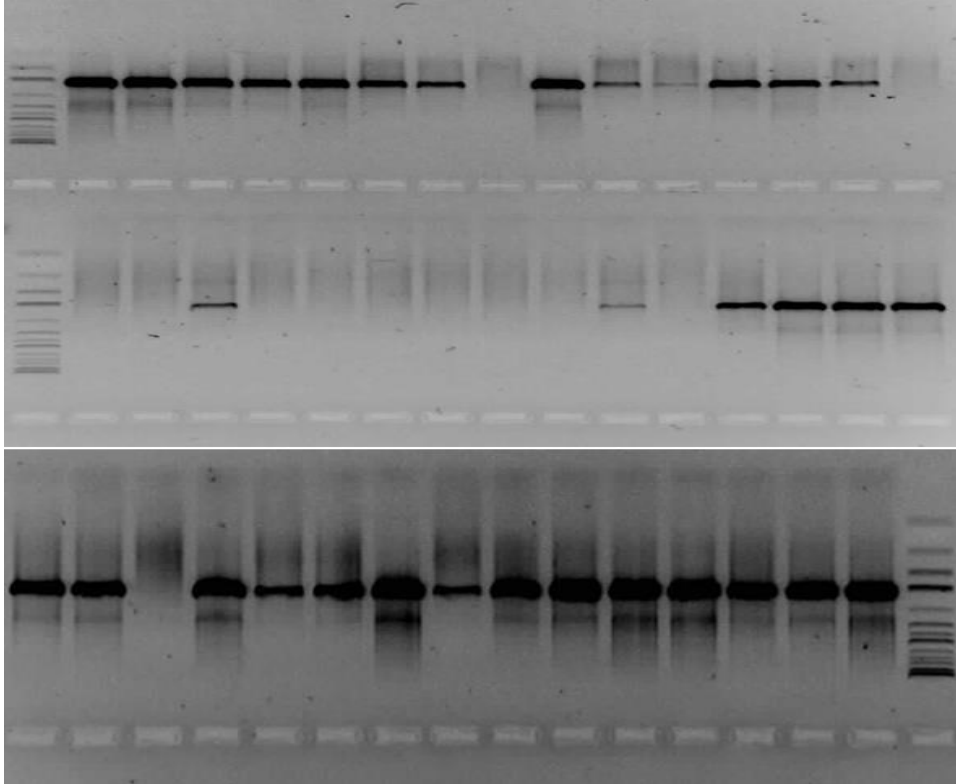
Çizelge 2. Biber genotiplerinin DAS-ELISA testi sonucu gösterdikleri absorbans değeri (405 nm)

Das-Elisa testi sonucunda negatif değerin iki katı ve daha fazla absorbans değeri veren örnekler virüsle bulaşık olarak belirlenmiştir. (Çizelge 2)

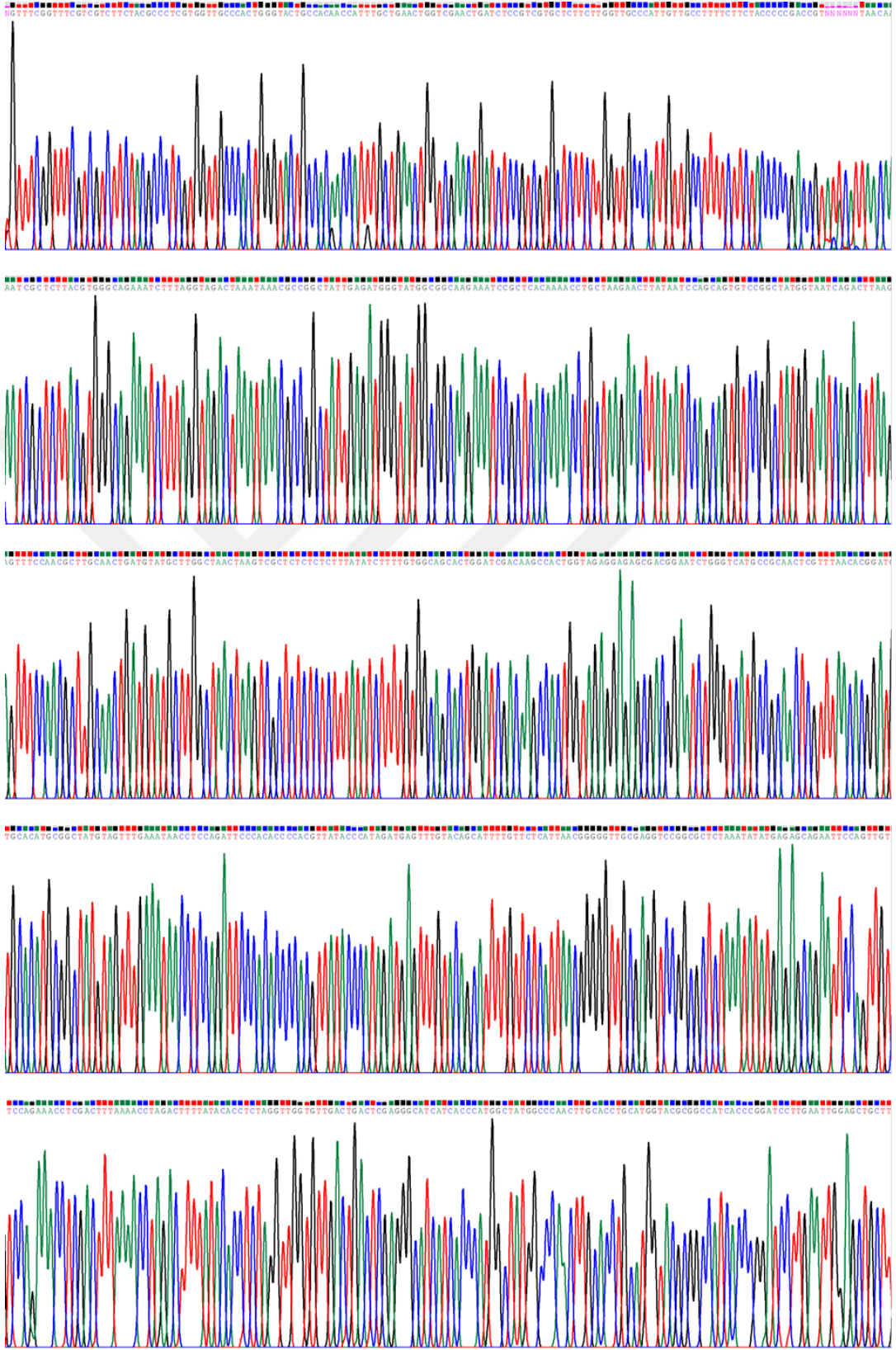
4.3. RT-PCR ve Dizileme Çalışmaları

Arazi çalışmaları sonucunda toplanan örneklerden izole edilen viral RNA tamamlayıcı DNA'ya dönüştürülerek Agaroz Jel üzerinde yürütülmüştür. Jel üzerinde bant veren örnekler sekans analizine gönderilmiş ve örneklerde PYLCV varlığı doğrulanmıştır (Şekil 7). Blast N (Altschul ve ark., 1997) analizi ile NCBI'da yer alan diğer viral genom karşılaştırmaları sonucu etmenin % 81 benzerlik oranı ile PYLCV olduğu belirlenmiştir.

Örnekler %1,5 agaroz jel üzerinde yürütüldüğünde yaklaşık 1,1 kb büyüklüğünde bant meydana getirmişlerdir (Şekil 8).



Şekil 8. Polerovirüs pozitif örneklerin agaroz jel üzerindeki görüntüsü (Marker 1kb)



Şekil 7. Örneklerden elde edilen RT-PCR ürünlerinin sekans kromatogramı

Walkey ve Pınk, (1990) bazı Ticari ve diğerk bazı marul çeşitlerinde *Beet Western Yellow Virüs* (BWYV)' ne tarla ve sera koşullarında dayanıklılık kaynaklarının belirlenmesi için yaptıkları çalışmada *Lactuca perennis* ve *L. muralis*'de aşırı dayanıklılık olduğu bildirmişlerdir.

Dogimont ve ark., (1997) kavunda (*Cucumis melo* L). *Cucurbit aphid-borne yellows luteovirus* (CABYV) dayanıklılığın iki bağımsız tamamlayıcı resisif gen tarafından sağlandığını belirlenmişlerdir.

Maisonneuve ve ark. (1991), *L. virosa* IVT 280 hattının BWYV'ye aşırı dirençli olduğu belirlemiş dayanıklılığı kontrol eden bu dominant gene Bw sembolünü vermişlerdir.

Marczewski ve ark., (2001) *Potato leafroll virus* (PLRV) dayanıklılık çalışmalarında 2 adet QTL bölgesi belirlemiş bu genler için SCAR markırlarını geliştirmiştir.

Çalışmada arazi çalışmalarında belirti göstermeyen ve ELISA testi sonucu negatif veya düşük konsantrasyonda bulunan bulunan PM 1694, PM 1088, PM 1615 ve PM 1050 genotiplerinin etmene dayanıklılık gösterebileceği düşünülmektedir. Ancak bu genotiplerin vektörler aracılığı ile dayanıklılıklarının doğrulanması gerekmektedir. Bu genotipler ile yapılacak melezlemeler daha sonraki dönemlerde biberlerde etmene dayanıklılık konusunda bilgiler verebilme potansiyeline sahiptir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Abiyotik ve biyotik faktörler kültür bitkileri yetiştiriciliğinde kalite ve verim kaybına neden olmaktadır. Viral etmenlerin neden olduğu kayıpların yıldan yıla değişmesi ve bu kayıplara karşı virüslere karşı kimyasal mücadelenin bulunmaması bitkilerdeki viral etmenlerin erken teşhisinin önemini bir kez daha öne çıkarmaktadır. Yapılacak teşhislerde simptomatolojik gözlemlerin serolojik, biyolojik ve moleküler testler gibi laboratuvar yöntemleriyle desteklenmesi şarttır.

Biber bitkisinde kalite ve verim kaybına neden olan viral etmenlerden biri de polerovirüslerdir. Dünyada ve Ülkemizde polerovirüsler ile ilgili çalışmalar son 15-20 yıl gibi kısa bir süre içerisinde yapılmış olup söz konusu çalışmalarda bu cins içerisinde yer alan virüslerin belirlenmesi, karakterizasyonu gibi çalışmalar yapılmıştır. Polerovirüslere dayanıklılık çalışmalarının olmaması nedeniyle çalışmada 30 biber genotipinin polerovirüs enfeksiyonuna karşı enfeksiyon ve dayanıklılık düzeylerin belirlenmeye çalışılmıştır. Surveylerde yaprak ve yaprak damar aralarındaki renk açılması, bitkide genel sarılık, meyvedeki şekil bozukluğu ve renk değişimleri gibi simptomatolojik gözlemler dikkate alınarak bitki yaprak ve meyvelerinden örnekler toplanmıştır. Simptomatolojik gözlemler dikkate alınarak toplanan örnekler bölgemizde daha önce yaygın olarak görülen polerovirüslerden CABYV'ne karşı DAS- ELISA testine tabi tutulmuştur. Bu virüsün DAS-ELISA testlerinde kullanılan antiserumlar diğer virüslerle çapraz reaksiyona girmektedir (Buzkan ve ark., 2013). Bu nedenle RT-PCR yöntemi ve sekans analizi ile tekrarlanması gerekmektedir. Bu nedenle etmen ait viral RNA örneklerden izole edilerek PYLCV olarak tanımlanmıştır. Birinci yılda vektör kullanılarak yapılan bulaştırmalarda Yolo Y, Yolo Wonder ve W4 genotiplerinin etmene dayanıklılık taşımadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar ikinci yıl sürdürülen arazi çalışmalarında da doğrulanmıştır. İkinci yıl çalışmalarında her iki tekrarda yüksek absorbans değeri gösteren Sangria etmene duyarlı bulunmuştur. Bununla birlikte çalışmada arazi çalışmalarında belirti göstermeyen ve ELISA testi sonucu negatif bulunan PM 1694, PM 1088, PM 1615 ve PM 1050 genotiplerinin etmene dayanıklılık gösterebileceği düşünülmektedir. Ancak bu genotiplerin vektörler aracılığı ile dayanıklılıklarının doğrulanması gerekmektedir

6. KAYNAKLAR

Agrios, G. N., (1997). Plant Pathology, Fourth Edition, Academic Press., San Diego,CA,USA 93-112, 192-193

Akıncı, S., Akıncı, İ.E., (1999). Kahramanmaraş Kırmızı Biber Yetiştiriciliğinin Sorunları. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği Karşısında Kahramanmaraş Biberinin Sorunları ve Çözüm Önerileri Paneli, (Kahramanmaraş, 6 Mart 1999).

Arlı-Sökmen, M., Mennan, H., Sevik, M.A., Ecevit, O. (2005). Occurrence of viruses in field-grown pepper crops and some of their reservoir weed hosts in Samsun, Turkey. *Phytoparasitica* 33: 347-358.

Balaji, B., Bucholtz, D.B., and Anderson, J.M., (2003). *Barley yellow dwarf virus* and *Cereal yellow dwarf virus* Quantification by Real-Time Polymerase Chain Reaction in Resistant and Susceptible Plants. *PHYTOPATHOLOGY* Vol. 93, No. 11, 2003

Bananej, K., Vahdat, A., Predajna, L., and GLASA, M., (2009). Molecular Characterization of Geographically Different *Cucurbit Aphid-Borne Yellows Virüs* Isolates. *Acta Virologica* 53: 61 – 64, 2009

Ben Khalifa M, Simon V, Marrakchi M, Fakhfakh H, Moury B, (2009). Contribution of host plant resistance and geographic distance to the structure of Potato virus Y (PVY) populations in pepper in Northern Tunisia. *Plant Pathology* 58, 763–72

Beuve, M., Stevens, M., Liu, H., Wintermantel, W.M., Hauser, S. & Lemaire, O. (2008). Biological and molecular characterization of an American sugar beet-infecting Beet western yellows virus isolate. *Plant Disease* 92: 51-60.

Bosland P.W. and Votava E.J. (1999). Peppers: Vegetable and Spice Capsicums. CABI publishing, New York, 177 pp.

Buzkan, N., Demir, M., Öztekin, V., Mart, C., Çağlar, B.K., Yılmaz, M.A. (2006). Evaluation of the status of capsicum viruses in the main growing regions of Turkey. EPPO Bulletin 36: 15-19.

Buzkan, N., D. Yüzer (2009). Kahramanmaraş kırmızı biberlerinde tohumla taşınan virüslerin moleküler tanısı. Alatarım 8 (1): 1-7.

Buzkan, N., Arpacı, B. B., Simon, V., Fakhfakh, H., and Moury, B. (2013). High prevalence of poleroviruses in field-grown pepper in Turkey and Tunisia. Archives of virology, 158(4), 881-885.

Collins, N. C., Paltridge, N. G., Ford, C. M., and Symons, R. H., (1996). The Yd2 gene for barley yellow dwarf virus resistance maps close to the centromere on the long arm of barley chromosome 3. Springer Theor Appl Genet (1996) 92:858-864.

Çandar, A ve Erkan, S., (2011). Bitkilerde Viral Etmenlere Karşı Genetik Dayanıklılık Mekanizmaları. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR (Eski adı: OrLab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi) Yıl: 2011 Cilt: 09 Sayı: 3 Sayfa: 13-27
www.mikrobiyoloji.org/pdf/702110303.pdf.

D'Arcy CJ, Domier LL, (2005). Luteoviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, eds. Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV. London, UK: Elsevier/Academic Press, 891–900.

Demir, M., (2005). Kahramanmaraş'ta Yetiştirilen Kırmızı Biberlerde Yaprakbiti ile Taşınan Virüslerin Saptanması yüksek Lisans Tezi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Kahramanmaraş. 28s.

Deng TC, Liao JY, Tsai CH., (2007). Occurrence of Cucurbit aphid-borne yellows virus in Taiwan. In: Jan FJ, Chen CC, Chen YK, Tzeng KC, eds. Proceedings of Insect Vecteded Plant Diseases and Their Control, 2007. Taipei, Taiwan: Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, 163–83.

Dogimont, C., Bussemakers, A., Martin, J.O., Slama, S., Lecoq, H., and Pitrat, M., (1997). Two complementary recessive genes conferring resistance to Cucurbit Aphid Borne Yellows Luteovirus in an Indian melon line (*Cucumis melo* L.). France. *Euphytica* 96: 391–395, 1997.

Dombrovsky, A., Glanz, E., Pearlsman, M., Lacman, O. and Antignus, Y. (2010). Characterization of pepper yellow leaf curl virus, a tentative new polerovirus species causing a yellowing disease of pepper. *Phytoparasitica* 38: 477-486.

Dombrovsky, A., Glanz, E., Lachman, O., Sela, N., Doron-Faigenboim, A and Antignus, Y., (2013). The Complete Genomic Sequence of *Pepper Yellow Leaf Curl Virus* (PYLCV) and Its Implications for Our Understanding of Evolution Dynamics in the Genus *Polerovirus*. *PLoS ONE* 8(7): e70722. doi:10.1371/ journal.pone.0070722

Duffus, J. E. (1960). Radish yellows: a disease of radish, sugar-beet, and other crops. *Phytopathology* 50:389-394.

Duffus, J. E., Russell, G. E. (1970). Serological and host range evidence for the occurrence of *Beet western yellows virus* in Europe. *Phytopathology* 60:1199-1202.

Fereres, A., and Raccah, B. (2009). Plant virus transmission by insects. eLS.

Ekbiç, E., Abak, K., Yılmaz, M.A., (1997). A New PVY Pathotype on Pepper Along Mediterranean Coastal Area of Turkey. Proc.10th Cong, Medit. Phytopath. Union, Montpellier, 1-5 June 1997. 187-189.

İlbağı, H., Çıtır, A., (2006). Bitkilerde Virüs Hastalıklarına Karşı Dayanıklılık Mekanizmaları. *Bahçe* 35 (1-2): 109 – 116.

Günay, A., (2005). *Sebze Yetiştiriciliği*. Cilt II, İzmir, Ankara, 351s.

Graichen, K., Rabenstein, F. (1996). European isolates of beet western yellows virus (BWYV) from oilseed rape (*Brassica napus* L. ssp. *napus*) are non-pathogenic on sugar beet (*Beta vulgaris* L. var. *altissima*) but represent isolates of turnip yellows virus (TuYV). *J. Plant Dis. Prot.* 103:233-245.

Hauser, S., Stevens, M., Mougel, C., Smith, H. G., Fritsch, C., Herrbach, E., and Lemaire, O. (2000). Biological, serological and molecular variability suggest three distinct *Polerovirus* species infecting beet or rape. *Phytopathology* 90:460-466.

Heiser C.H., Pickersgill Jr. B., (1969) Names for the cultivated *Capsicum* species (Solanaceae). *Taxon* 18: 277–283

Horn, F., Habekuß, A., and Stich, B., (2014). Genes involved in barley yellow dwarf virus resistance of maize. *Springer Theor Appl Genet* (2014) 127:2575–2584

Kanakala, S., Verma, H.N., Vijay, P., Saxena, D. R., and Malathi, V. G., (2013). Response of chickpea genotypes to *Agrobacterium*-mediated delivery of Chickpea chlorotic dwarf virus (CpCDV) genome and identification of resistance source. *SpringerAppl Microbiol Biotechnol* (2013) 97:9491–9501

Kawchuk, L. M., Martin, R. R., and McPherson, J., (1990). Resistance in Transgenic Potato Expressing the Potato Leafroll Virus Coat Protein Gene Expressing the Potato Leafroll Virus Coat Protein Gene. *Molecular Plant-Microbe interactions*, vol.3, No. 5, pp. 301-307, 1990

Knierim, D., Tsai, W. S., Deng, T. C., Green, S. K., and Kenyon, L. (2013). Full-length genome sequences of four polerovirus isolates infecting cucurbits in Taiwan determined from total RNA extracted from field samples. *Plant Pathology*, 62(3), 633-641.

Küçük, A., (2001). Collecting Solanaceae in Turkey. *Solanaceae Genetic Resources in Europe. European Cooperative Programme for Crop Genetic Resources Networks.* Nijmegen, The Netherlands p. 39–43.

Lecoq, H., Bourdin, D., Wipf-Scheibel, C., Bon, M., Lot, H., Lemaire, O., (1992). A new yellowing disease of cucurbits caused by a luteovirus, cucurbit aphid-borne yellows virus. *Plant Pathology*, 41, 749–761.

Lim, S., Yoo, R. H., Igori, D., Zhao, F., Kim, K. H., and Moon, J. S. (2015). Genome sequence of a recombinant brassica yellows virus infecting Chinese cabbage. Springer-Verlag Wien 2014, *Arch Virol* (2015) 160:597–600

Lorenzen, J.H., Piche, L.M., Gudmestad, N.C., Meacham, T., Shiel, P. (2006). A multiplex PCR assay to characterize Potato virus Y isolates. *Plant Dis.* 90, 935–940.

Mathews, R.E.F. (1992). *Diagnosis of plant virus diseases*. CRC Pres, Inc. Boca Raton, Florida, 374 pp

Marczewski, W., Flis, B., Syller, J., Schäfer-Pregl, R., and Gebhardt, C., (2001). A Major Quantitative Trait Locus for Resistance to *Potato leafroll virus* Is Located in a Resistance Hotspot on Potato Chromosome XI and Is Tightly Linked to *N*-Gene-Like Markers. *The American Phytopathological Society*, Vol. 14, No. 12, 2001, pp. 1420–1425

Maisonneuve, B., Chovelon, V and Lot, H., (1991). Inheritance of Resistance to Beet Western Yellows Virus in *Lactuca virosa* L. France. *Hortscience* 26(12):1543-1545. 1991.

Palloix, A., Abak, K., Gognalons, P., Daubeze, A. M., Guldur, M., Memouchi, G., Gebre-Selaissie, K., (1994). Virus Diseases Infecting Pepper Crops in Turkey. In: *Proceedings of 9th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union*, Kuşadası, Aydın, 1994, 469-472

Shang, Q. X., Xiang, H. Y., Han, C. G., Li, D. W., and Yu, J. L. (2009). Distribution and molecular diversity of three cucurbit-infecting poleroviruses in China. *Virus research*, 145(2), 341-346.

Singh, R.P., (1998). Reverse-transcription polymerase chain reaction for the detection of viruses from plants and aphids. *J. Virol. Methods* 74, 125–138.

Stevens, M., Freeman, B., LIU, H. Y., Herrbach, E., and Lemaire, O. (2005). Beet poleroviruses: close friends or distant relatives?. *Molecular plant pathology*, 6(1), 1-9.

Stevens, M., Smith, H. G., and Hallsworth, P. B. (1994). Identification of a second distinct strain of beet mild yellowing luteovirus using monoclonal antibodies and transmission studies. *Annals of applied biology*, 125(3), 515-520.

Stevens, M., Smith, H. G., and Hallsworth, P. B. (1994). The host range of beet yellowing viruses among common arable weed species. *Plant Path*

Stevens, M., McGrann, G., ve Clark, B., (2008). *Turnip yellows virus* (syn *Beet western yellows virus*): an emerging threat to European oilseed rape production. HGCA Research Review No. 69

Şimşek, D., Pınar, H., Mutlu, N., (2015). Moleküler Islah Yöntemleri Kullanılarak Tospovirus ve Tobamoviruslere Dayanıklı Yeni Dolmalık Biber (*Capsicum annum*L.) Hat ve Çeşitlerinin Geliştirilmesi. *Alatırım*2015, 14 (1): 1-8.

Waterhouse, P. M., Gildow, F. E., Johnstone, G. R. (1988). Luteovirus group. AAB Descriptions of Plant Viruses, no. 339.

Weilguny, H., Singh, R.P., (1998). Separation of Slovenian isolates of PVY(NTN) from the North American isolates of PVY(N) by a 3-primer PCR. *J. Virol. Methods* 71, 57–68.

Wilson, C. R., Lambert, S. J., Dann, A. L., Cross, P., and Hay, F. S. (2012). Occurrence of viruses within Tasmanian vegetable crops and identification of a novel Polerovirus infecting pea. *Australasian Plant Pathology*, 41(3), 311-319.

Xiang, H. Y., Shang, Q. X., Han, C. G., Li, D. W., and Yu, J. L. (2008). First identification of Beet western yellows virus on sugarbeet and lettuce in China. *Plant Pathology*, 57(2), 390-390.

Xiang, H. Y., Shang, Q. X., Han, C. G., Li, D. W., and Yu, J. L. (2008). Complete sequence analysis reveals two distinct poleroviruses infecting cucurbits in China. *Archives of virology*, 153(6), 1155-1160.

Zhang, X. Y., Dong, S. W., Xiang, H. Y., Chen, X. R., Li, D. W., Yu, J. L., and Han, C. G., (2014). Development of three full-length infectious cDNA clones of distinct brassica yellows virus genotypes for agrobacterium-mediated inoculation. China. Elsevier, *Virus Research* 197 (2015) 13–16

Yeşil, S., Ertunç, F., (2012). Bitki Virüsleriyle Mücadelede Yeni Stratejiler: Virüs Enfeksiyonlarına ve Vektörlerine Karşı Dayanıklılığın Geliştirilmesi. *Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der. / Iğdır Univ. J. Inst. Sci. &Tech.* 2(4): 19-28.

7. ÖZGEÇMİŞ

Kilis İli Merkez İlçesinde 1989 yılında doğan Alaittin APALAK ilk, orta ve lise öğrenimini aynı ilde tamamladı. Çukuruva Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nden 2012 yılında mezun oldu. Halen Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Kilis İl Müdürlüğü'nde Ziraat Mühendisi olarak görev yapmakta orta seviyede İngilizce konuşmakta ve yazmaktadır.



8. EKLER

Ek 1.

ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

1. Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.4 (Fosfat tampon çözeltisi)

8.0 gr NaCl

0.2 gr KH_2PO_4

2.9 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ veya

2.3 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1.44. gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

1.15 gr Na_2HPO_4 (anhdrous)

0.2 gr KCl

0.2 gr NaN_3

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip, pH'sı 0.1 N NaOH veya 0.1 N HCl ile ayarlanmış ve 4 °C'de saklanmıştır.

2. Coating Buffer pH 9.6 (Kaplama tampon çözeltisi)

1.59 gr Na_2CO_3

2.93 gr NaHCO_3

0.2 gr NaN_3

Yukarıda miktarı verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip, pH'sı ayarlanmış ve 4 °C'de saklanmıştır.

3. Washing Buffer (Yıkama tampon çözeltisi)

Bir litre PBS tamponu 0.5 ml Tween- 20 ilave edilerek hazırlanmıştır.

4. Sample Extraction Buffer (Örnek tampon çözeltisi)

Bir litre yıkama tamponu çözeltisi içine 20 gr Polyvinylpyrrolidone (PVP-40) ilave edilerek hazırlanmıştır.

5. Enzyme Conjugate Buffer (Konjugat tampon çözeltisi)

Bir litre örnek tampon çözeltisine 2 gr ovalbumin (egg albumin) ilave edilerek hazırlanmıştır.

6. Substrat Buffer pH 9.8 (Substrat tampon çözeltisi)

97 ml Diethanolamine 800 ml saf su içine ilave edildikten sonra, 0.2 gr NaN_3 eklenmiş ve HCl ile pH 9.8'e ayarlanarak 1 litreye tamamlanmıştır.