

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***Pepper Vein Yellows Virus (PeVYV)*'ün TÜM GENOM DİZİLEMESİ ve
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Ceren SERÇE ÖĞÜT

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KASIM 2020

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***Pepper Vein Yellows Virus (PeVYV)*'ün TÜM GENOM DİZİLEMESİ ve
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Ceren SERÇE ÖĞÜT

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KASIM 2020

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Pepper Vein Yellows Virus (PeVYV)*'ün TÜM GENOM DİZİLEMESİ ve**
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Ceren SERÇE ÖĞÜT
BİTKİ KORUMA
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FYL-2019-4975 nolu proje ile desteklenmiştir

KASIM 2020

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Pepper Vein Yellows Virus (PeVYV)*'ün TÜM GENOM DİZİLEMESİ ve**
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Ceren SERÇE ÖĞÜT
BİTKİ KORUMA
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 25/11/2020 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Hakan FİDAN (Danışman)

Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

Doç. Dr. Handan ÇULAL KILIÇ

ÖZET

***Pepper Vein Yellows Virus (PeVYV)*'ün TÜM GENOM DİZİLEMESİ ve MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Ceren SERÇE ÖĞÜT

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hakan FİDAN

Kasım 2020; 44 sayfa

Solanaceae familyasında yer alan biber (*Capsicum annuum*), dünyada ve ülkemizde üretim alanı ve miktarı bakımından ikinci sırada yer alan sebze türüdür. Örtü altı biber üretiminin en fazla olduğu Antalya ili ve çevresinde son zamanlarda *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) enfeksiyonuna sıkça belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında PeVYV'nin moleküler karakterizasyonu yapılarak nükleik asit dizilimleri ve protein düzeyi belirlenmiştir.

2019-2020 yılları arasında Antalya ilinde simptomatolojik olarak tespit edilmiş olan PeVYV cins ve tür bazındaki primerler ile RT-PCR çalışmaları yapılmıştır. PeVYV'nin genom primerleri kullanılarak tüm genom dizilemesi elde edilmiştir. Biber bitkilerinden alınan virionlar geçirimsiz elektron mikroskobu ile incelenmiştir ve 25 nm'lik küresel parçacıklar fotoğraflanmıştır. Biyoinformatik çalışmalar sonucunda PeVYVAnt01 izolatının, %95 oranında benzer bulunduğu Yunanistan'dan kaydedilen biber izolatı ve İtalya'dan kaydedilen biber izolatı ile aynı grupta yer aldığı tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Biber, Elektron mikroskop, Moleküler karakterizasyon, PeVYV, RT-PCR, Tüm genom, Virüs

JÜRİ: Doç. Dr. Hakan FİDAN

Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

Doç. Dr. Handan ÇULAL KILIÇ

ABSTRACT

FULL GENOME SEQUENCE AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Pepper Vein Yellows Virus (PeVYV)*

Ceren SERÇE ÖĞÜT

MSc Thesis in Plant Protection

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hakan FİDAN

November 2020; 44 pages

Pepper (*Capsicum annuum*), which is in the Solanaceae family, is grown most produced vegetable plants in the world and in our country in terms of production area and amount. *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) infection has been frequently encountered in Antalya and its surroundings, where greenhouse pepper production is highest. Nucleic acid sequences and protein levels were determined by molecular characterization of PeVYV in this thesis study.

The verification was performed by RT-PCR with the PeVYV genus and species-based primers that were detected symptomatologically in Antalya between 2019-2020. Whole genome sequencing was achieved using the genome primers of PeVYV. Virions taken from pepper plants were examined with a transmission electron microscope and spherical particles of 25 nm were photographed. As a result of bioinformatics studies, it was determined that PeVYVAnt01 isolate is in the same group with pepper isolate recorded from Greece and pepper isolate recorded from Italy, which is 95% similar.

KEYWORDS: Electron microscope, Full genome, Molecular characterization, Pepper, PeVYV, RT-PCR, Virus

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Hakan FİDAN

Assoc. Prof. Dr. Özer ÇALIŞ

Assoc. Prof. Dr. Handan ÇULAL KILIÇ

ÖNSÖZ

Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Moleküler Viroloji laboratuvarında gerçekleştirilen tez çalışmasında, ülkemiz için son derece önemli olan biber bitkisinin verim ve kalitesini etkileyen en önemli virüs hastalıklarından, *Pepper vein yellows virus*'ün (PeVYV) moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla, Antalya ilinde simptomatolojik belirti gösteren örnekler RT-PCR yöntemi ile testlenmiştir. PeVYV ile bulaşık tespit edilen örnekler geçirimli elektron mikroskobu ile incelenmiştir ve PeVYV'nin genom primerleri kullanılarak moleküler çalışmalar ile tüm genom dizilemesi elde edilmiştir.

Lisans ve Yüksek lisans sürecimde büyük emekleri geçen, bilgi, destek, tecrübe ve deneyimleri ile rehberlik eden değerli hocam ve tez danışmanın Doç. Dr. Hakan FİDAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez jürime katılarak görüş ve bilgileri ile tezime destek olan Doç. Dr. Handan ÇULAL KILIÇ ve Doç. Dr. Özer ÇALIŞ hocalarıma saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecinde Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümünde bulunan geçirimli elektron mikroskopunu kullanmamızda bize yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Hakan ER'e, çalışmada projemi destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu'na, çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Pelin SARIKAYA ve bölüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca benden maddi manevi desteklerini esirgemeyen, sevgileriyle beni bugünlere yetiştiren babam Hasan SERÇE ve annem Nilgün SERÇE'ye, başından bu yana desteği ile yanımda olan sevgili eşim Mehmet ÖĞÜT'e sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
AKADEMİK BEYAN	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	4
2.1. Dünyada Yapılan Çalışmalar	7
2.2. Ülkemizde Yapılan Çalışmalar	10
3. MATERYAL VE METOT.....	12
3.1. Materyal	12
3.2. Metot.....	12
3.2.1. Simptomatolojik çalışmalar	12
3.2.2. Virüs saflaştırma ve TEM (Transmission electron microscopy)	14
3.2.3. Moleküler Çalışmalar	14
3.2.3.1. RT-PCR çalışmaları ile tüm genom analizi çalışmaları.....	14
3.2.3.2. Sanger metodu ile dizi analizi ve filogenetik çalışmalar	17
4. BULGULAR	18
4.1. Simptomatolojik Bulgular.....	18
4.2. Virüs Saflaştırma ve TEM (Transmission electron microscopy) Bulguları	20
4.3. Moleküler Bulgular.....	21
4.3.1. RT-PCR çalışmaları ile tüm genom analizi bulguları	21
4.3.2. Sanger metodu ile dizi analizi ve filogenetik çalışmalar.....	22
4.3.2.1. PeVYV'nin ORF bölgeleri ve tüm genom dizilemesi	24
4.3.2.2. PeVYV'nin filogenetik analizleri.....	29
5. TARTIŞMA.....	32
6. SONUÇLAR.....	36
7. KAYNAKLAR.....	37
8. EKLER.....	41
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “*Pepper vein yellows virus (PeVYV)*’ün Tüm Genom Dizilemesi ve Moleküler Karakterizasyonu” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, yapılan tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

25/11/2020

Ceren SERÇE ÖĞÜT



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	: Santigrat Derece
%	: Yüzde
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre

Kısaltmalar

A	: Adenin
AeYV	: <i>African eggplant yellows virüs</i>
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
bp	: Baz çifti
C	: Sitozin
CABYV	: <i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>
CMV	: <i>Cucumber mosaic virüs</i>
CP	: Coat Protein - Kılıf Protein
ddH ₂ O	: Çift distil su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dk	: Dakika
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
ELISA	: Double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay
NPPO	: National Plant Protection Organization
FAO	: Food and Agriculture Organisation (Gıda ve Tarım Örgütü)
G	: Guanin
Kb	: Kilo baz çifti

kV	: Elektrik gerilimi birimi kilo-volt
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
ORF	: Okuma çerçevesi RB: Resistance Breaking-Dayanıklılığı Kıran İzolat
PCR	: Polymerase chain reaction
PeVYV	: <i>Pepper vein yellows virus</i>
PeLRCV	: <i>Pepper leafroll chlorosis virus</i>
PeYV	: <i>Pepper yellows virus</i>
PeWBVYV	: <i>Pepper whitefly-borne vein yellows virus</i>
PMMoV	: <i>Pepper mild mottle virus</i>
PVY	: <i>Potato virus Y</i>
PYLVCV	: <i>Pepper yellow leaf curl virus</i>
Rpm	: Rounds per minute (Devir/dakika)
RdRp	: RNA bağımlı RNA polimeraz
RT-PCR	: Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
Ss	: Tek iplikçikli
Sp.	: Species (Türler)‘in Kısaltması
T	: Timin
TAE	: (Tris-asetat-EDTA) Elektroforez buffer
ToBRFV	: <i>Tomato brown rugose fruit virus</i>
TEM	: Transmission electron microscopy – Geçirimli elektron mikroskop
TEV	: <i>Tütün etch virus</i>
TMV	: <i>Tobacco mosaic virus</i>
TNA	: Total nükleik asit
ToCV	: <i>Tomato clorosis virus</i>
TSWV	: <i>Tomato spotted wilt virüs</i>

TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
TVDV	: <i>Tobacco vein distortion virus</i>
TYLCV	: <i>Tomato yellow leaf curl virus</i>
UV	: Ultra Viole
V	: Volt
vd	: ve diğerleri



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1. Biber türlerinin meyveleri	1
Şekil 2. 1. Biberin dünya üzerinde yayılımı (FAO 2018).....	4
Şekil 2. 2. PeVYV'nin dünya genelinde yayılımı	5
Şekil 2. 3. Polerovirüs üyelerinin morfolojik yapısı (Anonim 2020)	6
Şekil 2. 4. PeVYV'nin genom yapısı (Dombrovsky vd. 2013)	6
Şekil 2. 5. PeVYV'nin biber bitkilerinde belirtileri	7
Şekil 3. 1. Toplanan örneklerde belirtilatolojik incelemeler	13
Şekil 4. 1. a) PeVYV'nin biber bitkilerindeki belirtilerine sera içerisinde genel bakış; b, c) Biber bitkilerinde bodurluk ve boğum aralarında kısalma gibi belirtilatolojik görüntüler	19
Şekil 4. 2. a, b) PeVYV'nin biber bitkilerindeki yaprak belirtilerine sera koşullarında genel bakış; c, d, e) Damarlar arası sararma, damarların yukarı doğru kıvrılması, yaprak boyutlarının küçülmesi ve yapraklarda şekil bozukluğu belirtileri.....	19
Şekil 4. 3. a) PeVYV ile enfekteli biber meyveleri ile sağlıklı meyvenin kıyaslanması; b) PeVYV'nin yaprak ve meyve belirtileri, c) PeVYV ile enfekteli meyvenin boyuna kesiti	20
Şekil 4. 4. PeVYV'nin kısmen saflaştırılmış virionlarının görüntüsü.....	20
Şekil 4. 5. PeVYV'nin tür ve grup primerleriyle yapılan RT-PCR optimizasyonu	21
Şekil 4. 6. PeVYV'ye özgü tüm genom primerleri kullanılarak elde edilen RT-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	22
Şekil 4. 7. Genom primerlerinin hizalanması.....	22
Şekil 4. 8. PeVYV'nin pozitif örneklerine ait sekans analizinin Chromas programındaki görüntüsü	23
Şekil 4. 9. PeVYV izolatının tür primerine spesifik PY-F3802 ve PY-F-3826-3846 primerlerine ait sekansların karşılaştırılması	23
Şekil 4. 10. PeVYV izolatının grup primerine spesifik PYDGroupUp-Down primerlerine ait sekansların karşılaştırılması.....	24
Şekil 4. 11. PeVYVAnt01 izolatının P0 proteinine ait açık okuma bölgeleri (ORF0)	27
Şekil 4. 12. PeVYVAnt01 izolatının P1 proteinine ait açık okuma bölgeleri (ORF1)	27
Şekil 4. 13. PeVYVAnt01 izolatının P2 proteinine ait açık okuma bölgeleri (ORF2)	27

Şekil 4. 14. PeVYVAnt01 izolatının kılıf proteinine ait açık okuma bölgeleri (ORF3)	28
Şekil 4. 15. PeVYVAnt01 izolatının movement proteinine ait açık okuma bölgeleri (ORF4).....	28
Şekil 4. 16. PeVYVAnt01 izolatının P5 proteinine ait açık okuma bölgeleri (ORF5)	29
Şekil 4. 17. PeVYVAnt01 izolatının dünya izolatlarıyla kıyaslaması	30
Şekil 4. 18. PeVYVAnt01 izolatı ile dünya izolatları arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren ağaç.....	30
Şekil 4. 19. Filogenetik ağaçta kıyaslanan PeVYVAnt01 izolatının genetik uzaklık tablosu.....	31
Şekil 5. 1. Dünya izolatları ile PeVYVAnt01 izolatının genom organizasyonu karşılaştırması.....	34

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. 1. 2019 yılına ait Antalya biber üretim bilgileri	2
Çizelge 3. 1. PeVYV'nin grup ve tür primer çiftleri, bölgenin moleküler büyüklüğü	15
Çizelge 3. 2. RT-PCR yapımında kullanılan malzemeler	15
Çizelge 3. 3. RT-PCR protokolü	15
Çizelge 3. 4. RT-PCR çalışmalarında kullanılan primer çiftleri ve dizilimleri (Lotos vd. 2017)	16
Çizelge 4. 1. PeVYV'nin filogenetik analizde kullanılan izolatlar	30

1. GİRİŞ

Yeni dünya türü olarak adlandırılan *Capsicum annuum* (biber), *Solanaceae* familyası içerisinde yer almaktadır (Govindarajan vd. 1986). Anavatanı, Güney Amerika ve Güney Brezilya olduğu bildirilen *Capsicum annuum* L., sıcak ve ılıman iklimlerde yetiştirilmektedir. Christopher Colomb ve arkadaşları 1492 yılında Amerika'yı keşfettikleri sırada acı meyveleri olan bitkiler ile karşılaşmış ve bu bitkinin acı biber olduğunu keşfetmişlerdir. Biber bitkisi, Amerika'dan Avrupa'ya daha sonra Çin, Hindistan, İspanya ve tüm Avrupa ülkelerine yayılmıştır. 16. yy. içerisinde Hindistan, İspanya ve İtalya ülkeleri ile Osmanlı İmparatorluğu arasındaki ticaret sayesinde İstanbul'a ulaşmıştır (Andrews 1999).

Capsicum cinsi içinde 30'dan fazla tür vardır. *Capsicum* cinsinin çoğu $2n=24$ kromozomlu olmakla birlikte yabani biberlerde $2n=48$ kromozoma sahip türler bulunmaktadır (Krug 1986). *Capsicum* cinsi içerisinde altı ana tür olan *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum*, *C. pubescens* ve *C. assamicum* en yaygın olarak yetiştirilen türlerdir (Lee 2019).



Şekil 1. 1. Biber türlerinin meyveleri (Anonymus 2020)

Biber, insanların gıda ihtiyacını ve ilaç sanayi hammadde karşılamak üzere dünya çapında yetiştiriciliği yapılan sebze türlerinden birisidir. Yaygın olarak yetiştirilen biber tipleri; sofralık olarak sivri, dolmalık, çarliston, kapyra, turşuluk biberler, süs biberleri ve kurutmalık olarak yerel biberler gibi tiplerdir. Biberin insan sağlığı üzerindeki faydaları

oldukça önemlidir. Yeşil biberler A provitamini, B1, B2, C, E vitaminlerince zengindir. Kapsaisin alkoloiti içermektedir (Bozokalfa ve Eşiyok 2010). Kapsaisin; safra oluşumunu uyarak kolesterolün vücuttan atılımı için önemli rol oynar, antikarsinogenik, analjezik, antioksidan, antijenotoksik ve antimutajenik olmak üzere birçok farmakolojik etkiye sahiptir, iştah açıcı ve idrar arttırıcı etkisi vardır ve sindirimi kolaylaştırdığı bilinmektedir (Arın 2018).

Dünyadaki toplam biber üretimine bakıldığında 2018 yılı itibari ile 1.990.433 ha alanda 36.771.482 ton üretim yapılmıştır. Ülkeler bazında üretimde 18.214.018 ton ile birinci sırada yer alan Çin'i, 3.379.289 ton ile Meksika takip etmektedir. Türkiye ise 2.625.669 ton ile üçüncü sırada yer almaktadır (FAOSTAT 2018). 2019 yılında Türkiye yaklaşık 2.630.000 ton biber üretimi yapılmıştır. Antalya'nın payı ise 63.270 dekar biber üretim alanında 501.213 ton ürün elde etmiştir. Antalya biber üretiminin Türkiye'deki payı %19'dur (TÜİK, 2019). Antalya bölgesinde biber türlerine ait üretim bilgileri çizelge 1.1'e aktarılmıştır.

Çizelge 1. 1. 2019 yılına ait Antalya biber üretim bilgileri

Ürün	Dekar	Ton
Salçalık (kapyra)	15587	131920
Dolmalık	13597	104730
Sivri	26142	177479
Çarliston	7944	87084

Türkiye örtü altı yetiştiriciliğinde en yaygın sebzelerin başında domates ve ikinci sırada biber yer almaktadır. Ülkemiz şartlarında biber üretimi hem açıkta hem örtü altında yapılabilen; fakat iklim değişikliği, toprak isteği ve ekim nöbeti tercihindan dolayı her bölgede yetiştirilememektedir. Biber üretiminde önemli kayıplara neden olan başlıca sorunlar biyotik ve abiyotik faktörler olarak ikiye ayrılmaktadır. Biyotik etmenler içerisinde yer alan fungus, bakteri, nematod ve virüs kaynaklı pek çok hastalık etmeni bibere arız olmakta ve bunun sonucunda da kalite ve verim kayıpları ortaya çıkmaktadır (Fidan ve Sarıkaya 2020). Bu hastalık etmenleri arasında en çok virüs hastalıkları verim kaybına sebep olmaktadır. Ayrıca dünyanın pek çok yerinde biber yetiştirilen alanlarda verim düşüklüklerinin yanı sıra, meyve kalitesinde de bozukluklara sebep olmaktadır (Fidan ve Barut 2019).

Dünya genelinde biber yetiştirilen alanlarda ciddi problemler oluşturan 43'ün üzerinde virüs rapor edilmiştir (Çelik vd. 2013). Ülkemiz ise biber üretimini olumsuz yönde etkileyen en önemli virüsler; *Potato virus Y* (PVY), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) ve *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) gibi majör virüslerdir (Fidan ve Barut 2019; Fidan vd. 2020)

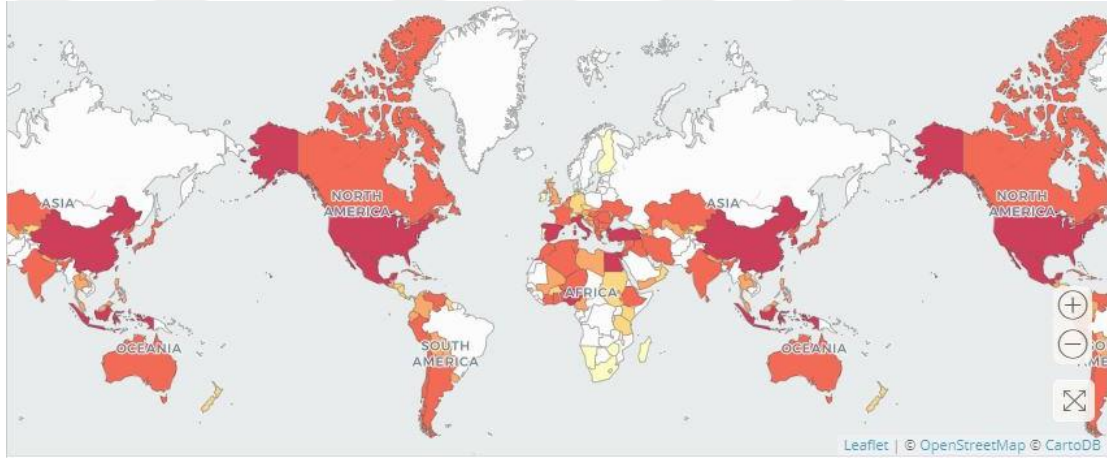
Son zamanlarda majör virüslere karşı kültürel mücadeleler ve dayanıklılık çalışmalarının artması üzerine yaygınlığı artan minör virüsler üretim alanlarında sıklıkla

görülmektedir. Yaygınlığı artan minör virüslerden birisi de Biber damar sarılık virüsü (*Pepper vein yellows virus* (PeVYV))'dür. Luteoviridae familyası Polerovirüs cinsinde yer alan PeVYV yaklaşık 25 nm'lik bir ikosahedral simetriye ve 6.2 kb'lık bir tek sarmallı pozitif duyarlı RNA genomuna sahiptir. PeVYV'ler çok yaygın iki yaprak biti, *Aphis gossypii* (kavun ve pamuk yaprak biti) ve *Myzus persicae* (şeftali-patates yaprak biti) ile yayılmaktadır. Mekanik olarak taşınmamaktadır. Enfeksiyonun erken evrelerinde, hastalığın simptomlarını tespit etmek zordur ve sonraki aşamalarda kuraklık veya besin eksikliği olarak karıştırılabilmektedir (Fox ve Lloyd 2018). PeVYV'nin Türkiye'de ilk raporu Buzkan ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları bir çalışma ile bildirilmiştir. Antalya ili ve çevresinde bulunan biber üretim alanlarında PeVYV'nin artışı oldukça fazladır. Son zamanlarda sıkça rastlanan PeVYV oldukça tehlike oluşturmaktadır.

Dünyada PeVYV ile ilgili birçok çalışma yapılmış; bu virüs izolatlarının genetik anlamda karakterizasyonu elde edilmiştir (Lotos vd. 2017; Dombrovsky vd. 2013). Buna rağmen ülkemizde PeVYV'nin tüm genomu elde edilmemiştir. Yapılan çalışma sonucunda PeVYV'nin tüm karakterizasyonu elde edilip veriler gen bankasına (NCBI) kaydedilmiştir. PeVYV izolatının dünyadaki kayıtlar ile benzerlik oranları belirlenerek ve en yakın hangi izolat ile ilişki kurduğu araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda yapılacak yayın ve makaleler ile kamu ve tarım sektörünün bu hastalıktan haberdar olması ve önlemini alması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

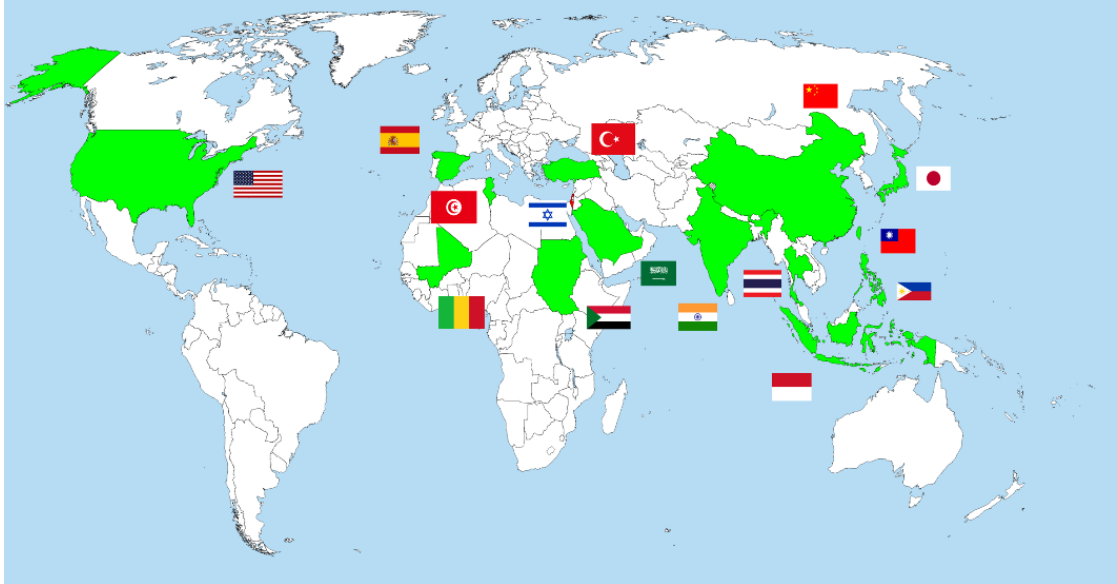
Sıcak ve ılıman iklimlerde yetiştirilen biber (*Capsicum sp.*), *Solanaceae* familyası içerisinde yer almaktadır (Govindarajan vd. 1986). Biber (*Capsicum annuum*), 16.yy'dan bu yana kültürümüze, soframıza ve toprağımızda yer edinen, ülkemizde büyük öneme sahip bir sebzedir. Taze, konserve, salça, turşu, sos, ketçap, kurutularak toz ve pul biber yapımında, boya sanayisinde, ilaç sanayisinde vb. gibi çeşitli ve geniş alanlarda kullanılmaktadır (Duman vd., 2002). Anavatanı, Güney Amerika ve Güney Brezilya olduğu bildirilse de dünya üzerinde iklimsel olarak uyumlu olan her bölgede yetiştirilmektedir (Andrews 1999). Biber dünya çapında yetiştiriciliği yapılan bir sebze olup; Çin birinci sırada, Meksika ikinci sırada ve Türkiye üçüncü sırada yer almaktadır (FAOSTAT 2018). Ülkemiz şartlarında biber üretimi hem açıkta hem örtü altında yapılabilir; fakat iklim değişikliği, toprak isteği ve ekim nöbeti tercihinin dolaylı Ege, Akdeniz, Güneydoğu Anadolu ve Marmara bölgelerinde yapılmaktadır. Bu üretim genellikle Antalya, Adana, Kahramanmaraş, Mersin ve Şanlıurfa illerinin ana üreticiler olduğu bilinmekte ve birinciliği Antalya sürdürmektedir (TÜİK 2019).



Şekil 2. 1. Biberin dünya üzerinde yayılımı (FAO 2018)

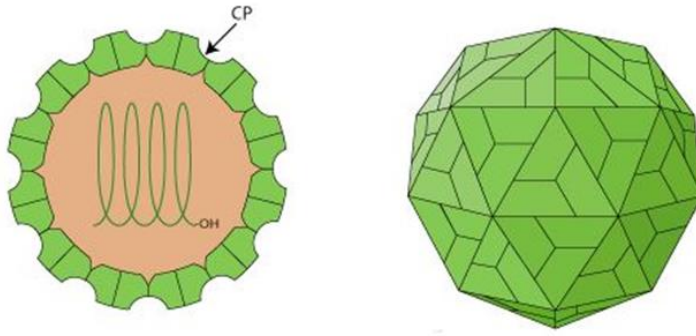
Biber üretimi yapılan açık tarla ve örtü altında verim ve kaliteyi sınırlandıran birçok biyotik ve abiyotik faktörler karşımıza çıkmaktadır. Biber yetiştiriciliği yapılan alanlarda hem verimi hem de kaliteyi etkileyen en önemli faktörlerin başında virüs hastalıkları gelmektedir. Biber yetiştiriciliği yapılan alanlarda en sık karşılaşılan vektörler; yaprak bitleri (*Myzus persicae* ve *Aphis gossypii*), thripsler (*Thrips tabaci*, *Frankliniella occidentalis*) ve beyazsinekler (*Bemisia tabaci*) olarak bilinmektedir ve bu vektörler virüslerin taşınımında önemli rol oynamaktadır (Fidan ve Barut 2019). Dünya genelinde biberde ciddi problemler oluşturan 43'ün üzerinde virüs rapor edilmiş olup ülkemizde biberde görülen majör virüsler olarak; *Potato virus Y* (PVY), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), *Tütün etch virüsü* (TEV), *Tomato chlorosis virus* (ToCV) ve *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) olduğunu belirtmişlerdir (Fortes vd. 2012; Buzkan vd. 2013; Fidan ve Sarı 2018; Fidan ve Barut 2019; Fidan ve Sarıkaya 2020; Fidan vd. 2019; Fidan vd. 2020).

Biberde görülen majör virüslerin çok iyi tanınmasından dolayı yaygınlığı artan minör virüsler üretim alanlarında fark edilmeye başlanmıştır. Son zamanlarda sıklıkla görülen minör virüslerden birisi de *Pepper vein yellows virus* (PeVYV)'tür. PeVYV'nin ilk raporu ilan edilirken o bölgedeki yaygın simptomuna göre isimlendirmeler yapılmıştır. Örneğin; *Pepper yellow leaf curl virus* (PYLCV), *Pepper yellows virus* (PeYV), *Pepper leafroll chlorosis virus* (PeLRCV), *Pepper vein yellows virus* (PVYV) vs. Fakat çalışmalar sonucunda elde edilen nükleotid dizilimleri gen bankasına kaydedildiğinde PeVYV ile benzerlikler meydana gelmiştir. Ayrıca International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) da sadece *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) olarak isimlendirme mevcuttur (ICTV 2011). Biber damar sarılık virüsü olarak da adlandırılmaktadır. *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) 1981'de ilk kez Japonya'nın Okinawa kentindeki seralarda gözlenmiş ve Luteoviridae familyasına ait olduğu tespit edilmiştir (Yonaha vd. 1995). PeVYV'ler 5 kıtada 20 ülkede kaydedilmiştir. Bu virüsler ABD'de Kuzey Amerika'da, Afrika'da Fildişi Sahili'nde, Mali, Benin Cumhuriyeti, Sudan ve Tunus'ta, Asya'da Çin, Hindistan, Endonezya, İsrail, Japonya, Pakistan, Filipinler'de, Tayvan'da ve Tayland'da, Avustralya'da ve Avrupa'da Yunanistan, İtalya, İspanya ve Türkiye'de bulunmuştur ve PeVYV ile ilgili olduğu tespit edilmiştir (NPPO 2016).



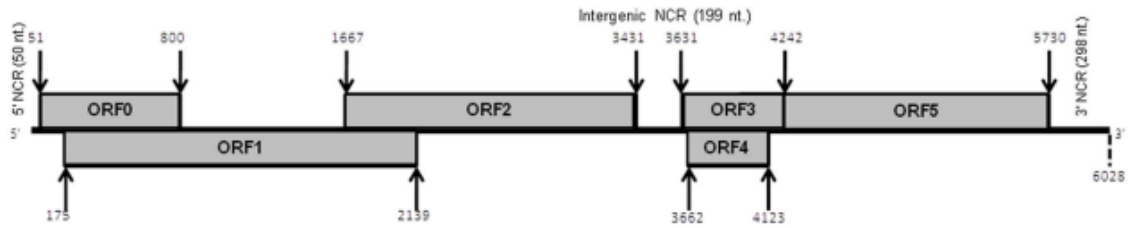
Şekil 2. 2. PeVYV'nin dünya genelinde yayılımı

PeVYV, *Luteoviridae* familyası *Polerovirüs* cinsinin üyesi olup genomu yaklaşık 6244 nükleotitten oluşmaktadır. Yaklaşık 25 nm'lik bir ikosahedral simetriye sahip tek sarmallı (ss) pozitif duyarlı RNA virüs genomuna sahiptir (Yonaha vd. 1995) (Şekil 2.3).



Şekil 2. 3. Polerovirüs üyelerinin morfolojik yapısı (Anonim 2020)

PeVYV'nin RNA genomu, altı open reading frame (açık okuma alanları) bulunmaktadır (ORF'ler). ORF0, 28.14 kDa'lık ortalama molekül ağırlığına sahiptir ve protein 0'ı (P0) kodlamaktadır. ORF1'in ortalama molekül ağırlığı 72.12 kDa olan protein 1'i (P1) kodlamaktadır. Protein 1 serin proteaz aktivitesi gösterdiği bilinmektedir. RNA'ya bağlı RNA polimeraz (RdRp) bölgesi ORF2'de yer almaktadır. ORF2'nin ortalama molekül ağırlığı 65.58 kDa protein 2'yi (P2) kodlamaktadır. ORF3, 22.51 kDa kılıf proteinini (CP) kodlamaktadır ve hareket proteinini kodlayan ORF4 ile örtüşmektedir. ORF5 ve ORF3 birbirleriyle bitişiktir. ORF5'in birleşmiş ürünlerini içeren küçük kılıf proteinini (CP) üretmektedir ve ortalama molekül ağırlığı 77.94 kDa'lık bir 'okuma' proteininden sorumlu olan okuma alanına sahiptir (Dombrovsky vd., 2013) (Şekil 2.4).



Şekil 2. 4. PeVYV'nin genom yapısı (Dombrovsky vd. 2013)

Biyoloji biliminde; hücre, molekül, organizma gibi örneklerin kendilerini çoğaltması süreci replikasyon olarak tanımlanmaktadır. PeVYV'nin virüs replikasyonu konukçu hücreye nüfuz ederek başlamaktadır. Virüsün kılıfının açılması ve viral genomik RNA'nın sitoplazmaya salınması ile viral RNA ORF1 ve ORF2, RdRp füzyon proteinini üretmek için dönüşmektedir. Replikasyon, sitoplazmik viral fabrikalarda gerçekleşmektedir. Bir dsRNA genomu, genomik ssRNA'dan (+) sentezlenmektedir. dsRNA genomu kopyalanır, böylece viral mRNA'lar yeni ssRNA (+) genomlarını oluşturmaktadır. Translasyon aşamasında 3 'sıralı sgRNA'ların ifadesi; sgRNA'ların nesilden nesile aktarılmasını, virüsün kılıfını, kılıf protein okuma alanını ve hareket proteinini sentezlemektedir. Viral kapsidler boş olarak hücrenin çeşitli yerlerinde sentezlenmektedir ve bu aşamadan sonra viral genom kapsid içine paketlenmektedir. Viral hareket proteinini ise virüsün hücreden hücreye transferine aracılık etmektedir (Anonim 2020).

PeVYV'lerin en önemli konukçuları *Capsicum* türleri, *C. annum* ve *C. frutescens*'tir, ancak çok yıllık bir bitki olan *Solanum nigrum* da enfekte olarak kaydedilmiştir (Knierim vd. 2010). Sadece deneysel olarak enfekte olan konukçular, *Chenopodium amaranticolor*, *Curcubita pepo* (squash), *Datura stramonium*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana benthamiana*, *Petunia hibrid*, *Petunia florida* olarak bilinmektedir (Dombrovsky vd. 2010).

Enfeksiyonun erken evrelerinde, PeVYV'nin simptomlarını tespit etmek zordur ve sonraki aşamalarda kuraklık veya besin eksikliği olarak yanlış yorumlanabilmektedir. PeVYV'nin simptomları; ağaçlarda bodurlaşma, damarlar arası sararma ve damarların yukarı doğru kıvrılması, yaprak boyutlarının küçülmesi, meyvelerde boyut küçülmesi ve renk değişikliği olarak gözlenmektedir (Şekil 2.5) (Fox ve Lloyd 2018).



Şekil 2. 5. PeVYV'nin biber bitkilerinde simptomları

PeVYV'ler çok yaygın iki yaprak biti, *Aphis gossypii* (kavun ve pamuk yaprak biti) ve *Myzus persicae* (şeftali-patates yaprak biti) ile taşınmaktadır. Ancak mekanik inokulasyonla taşınma gerçekleşmemektedir (Lecoq vd. 1992; Fox ve Lloyd 2018). Yaprak bitleri hem açık alanda hem de korumalı yetiştiricilikte kalıcı problemlerdir. Virüs taşıyan bir vektör, enfekte olmayan bir konukçunun floeminden beslenmektedir ve persistent (sirkülatif) bir şekilde taşınmaktadır.

2.1. Dünyada Yapılan Çalışmalar

Lotos vd. (2014) Polerovirüslerin kapsamlı tespiti için yapılan çalışmada iki aşamalı bir RT-PCR deneyi geliştirilmiştir. RdRp kodlama bölgesi, Luteoviridae ailesindeki diğer üyelerinkinden önemli ölçüde farklı olduğundan ve dizisi viral genomdaki diğer bölgelerden daha bilgilendirici olabileceğinden, primerler bu bölgelerden tasarlanmıştır. Kapsamlı RT-PCR'ın ampikon dizisini kullanan filogenetik analiz sonucunda polerovirüsleri tür düzeyinde ayırt edebileceğini göstermiştir. Genel olarak, Polerovirüs enfeksiyonlarının güvenilir tespiti için ve spesifik RT-PCR'lar ile kombinasyon halinde, cins içindeki yeni ve karakterize edilmemiş türlerin tanımlanması için uygulanabilmektedir. Yunanistan'da ortaya çıkan sarı renkli biber bitkilerinin araştırılması üzerine *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) ile yakından ilişkili bir polerovirüs olarak tanımlanmıştır. RNA'ların yeni nesil dizilimi ile tam genom dizisinin elde edilmesi sırasında geçici olarak *Pepper yellows virus* (PeYV) olarak adlandırılmış ve yeni bir polerovirüs PeVYV olarak karakterizasyonu yapılmıştır (Lotos vd. 2017).

Murakami vd. (2011) PeVYV ile enfekte olmuş biber bitkisiyle beslenen vektör böceklerinden (*Aphis gossypii*) izole edilen RNA örneklerinin rastgele amplifikasyonu kullanılarak PeVYV'nin tüm genomu dizilmiştir. PeVYV genomu 6244 nükleotitten oluşmuş ve Polerovirüs cinsinin üyelerinin karakteristik bir genomik organizasyonuna sahip olduğu bildirilmiştir. PeVYV'nin belirgin bir şekilde farklı bir virüs olduğunu ve Polerovirus cinsinin yeni bir türüne ait olduğunu tespit etmişlerdir. 2017 yılında sera içerisinde yapılan bir çalışmada *Aphis gossypii*'nin farklı suşları farklı konukçular üzerinde beslendirilmiş ve tüm suşlar sadece *Capsicum annum*'a PeVYV'ü taşıdığı gözlemlenmiştir. *Aphis gossypii*'nin O ki suşu ise *Capsicum frutescenes*'in PeVYV'ü taşıdığı gözlemlenmiştir. Türe özgü primeler ve tüm genom primerleri tasarlanarak PeVYV saptanmıştır. Yapılan diğer çalışması ile arasında önemli bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Filogenetik analizlerde Avrupa, Asya ve Afrika daki ülkeler arasında benzerlik saptanmıştır (Murakami vd. 2017).

Villanueva vd. (2013) Aralık 2012 ve Ocak 2013 dönemi içerisinde İspanya'nın güneyindeki Almería eyaletinde PeVYV ciddi salgınlar meydana getirmiş ve birçok sera neredeyse %100 görülme sıklığı göstermiştir. Farklı seralardan alınan bitki örneklerine serolojik ve moleküler testler yapılmış ve sekans sonuçları gen bankasında incelenmesi sonucunda %99 oranında PeVYV'e benzetilmiştir. Filogenetik analiz sonucunda İspanya izolatı Türkiye'den bir PeVYV izolatı ile (FN600344, PYV olarak adlandırılmıştır) %98,5 ila %98,7 benzerlik görülmüştür.

Zhang vd. (2015) Çin'in Hunan Eyaletindeki biber seralarında PeVYV'e benzeyen belirtiler gözlenmiştir. Seralardan alınan örnekler elektron mikroskopunda incelenmiş ve seyrek ancak tipik ikosahedral viryonlar gözlenmiştir. Küçük RNA kütüphanesi oluşturularak yeni nesil sekanslama analizi sayesinde viral genom elde edilmiştir. NCBI'da karşılaştırma yapılmış ve PeVYV'nin de içinde bulunduğu 13 virüs ile benzerlik tanımlanmıştır. Bunun üzerine PeVYV'nin kaplama proteininden oluşturulmuş primer ile test edilmiş ve elde edilen sekanslar Tayvandaki PeVYV izolatları ile %99 oranında benzerlik göstermiştir. Çalışma sonucunda PeVYV'nin tespiti ile Çin'de ilk rapor yayınlanmıştır.

Liu vd. (2016) Hunan Sebze Enstitüsü'nde (Changsha, Hunan, Çin) yetiştirilen biber bitkilerinden izole edilen PeVYV (PeVYV-HN, erişim numarası KP326573) genom sekansı, derin sekanslama ile belirlenmiştir. Kaplama proteinine (CP), hareket proteinine (MP) ve RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRP) dayalı evrimsel analiz sonucunda Afrika ve Asya PeVYV izolatları, coğrafi kökenlerine karşılık gelen iki farklı popülasyona bölünebileceğini ve bu da ayrı ayrı evrimleşmiş olabileceklerini varsaymışlardır.

Tomassoli vd. (2016) 2014-2015 yılında, Lazio bölgesinin (Viterbo ve Roma) farklı illerindeki biber arazilerinde yapraklarda sararma belirtisi gözlenmiş fakat bitki besin element eksikliği ile karıştırılmıştır. Biber türlerini *Tomato chlorosis virus* (ToCV)'ın enfekte ettiği bildirilmiştir. Ancak yapılan testler sonucunda ToCV'e negatif çıkmıştır. Ardından Polerovirüs grubuna ait primer ile test edilmiştir. PeVYV izolatları ile %96 oranında benzerlik görülmüştür.

Maina vd. (2016) Kuzeybatı, Avustralya'dan gelen biberlerde enfeksiyon yapan (*Capsicum annuum*) virüsler incelenmiştir. Polerovirüs grubu içerisinde olan *Pepper vein yellows virus* tespit edilmiştir. PeVYV genomu 6,244 nükleotid elde edilmiş ve *Polerovirus* cinsinin tipik altı açık okuma çerçevesi (ORF); ORF0, ORF1, ORF2, ORF3, ORF4 ve ORF5 ile benzer ORF bölgeleri tespit edilmiştir. Japonya ve Çin'den gelen tüm PeVYV genomları ile karşılaştırılmış. Avustralya genomu, Japon genomu Çin genomundan daha yakın olduğu savunulmuştur. Ayrıca Avustralya'daki bir biber bitkisinden elde edilen *Polerovirüs*, PeVYV'nin ilk tüm genomik RNA dizisi olarak sunulmuştur.

Afouda vd. (2017) Güney ve Kuzey Benin'de 2014 ve 2015 yıllarında biberlerde görülen virüsleri tespit etmek için araştırmalar yapılmıştır. PeVYV tespit etmek için polerovirüs grup primeri kullanılmış ve pozitif kontrol olarak İspanya ırkı göz önüne alınmıştır. Elde edilen sonuçlar ile Benin'de ilk rapor olarak sunulmuştur.

Dombrovsky vd. (2010) İsrail'de biber ürünlerinde yeni bir yıkıcı hastalığa neden olan viral bir patojenin teşhisini rapor etmişlerdir. PYLCV, biber türlerinde ve biberde konukçuluk yapan yabancı otlar üzerinde yaprak bitleri aracılığı ile bulaştırma yapılmış ve *Capsicum annuum*, *Chenopodium amaranticolor*, *Cucurbita pepo* cv. *maya*, *Datura stramonium*, *Nicotiana clevelandii*, *Petunia hybrida* ve *Physalis floridana* da simptomatolojik belirtiler gözlemlenmiştir. Ayrıca yapılan ELISA test sonuçları pozitif çıkmıştır. Bunun üzerine virüsün görüntüsü virüs saflaştırılmış preparatların analizi sonucunda izometrik virüs parçacıklarının 25 nm boyutunda varlığını göstermiştir. Virüs nükleik asit karakterizasyonu viral ribonükleik asit (RNA) saflaştırılmış ve ~6 kb büyüklüğünde tahmini bir RNA fraksiyonu tespit edilmiştir. Polerovirüs cinsi içerisindeki virüslerle karşılaştırma yapılmıştır. *Polerovirüs* cinsinin bir diğer üyesi olan *Tobacco vein distortion virüsü* (TVDV) ile amino asit düzeyinde %92 benzerlik göstermiştir. 2013 yılında ise *Pepper yellow leaf curl virus* (PYLCV) olarak adlandırılan *Polerovirus* cinsinin varsayılan bir üyesinin genomunun tam dizisini ve organizasyonunu belirlemiştir. PYLCV, *Tobacco vein distortion* virüs'ten (TVDV) daha geniş bir konukçu aralığına ve *Cucurbit aphid-borne yellows virüs* (CABYV) (her iki polerovirüs) ile yakın serolojik bir ilişkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Hem PYLCV hem de (PeVYV), ortak bir atasal polerovirüse işaret eden dizileri içerdiği belirlenmiştir. PYLCV'nin tam genomu, 6.028 nükleotitten oluştuğu ve altı açık okuma çerçevesi (ORF'ler) içeren tipik bir polerovirüs genom organizasyonu olduğu belirlenmiştir. PYLCV ve PeVYV, çok benzer nükleotid ve amino asit sekanslarına sahip olduğu belirtilmiş ve her iki virüs de biber bitkilerini enfekte edebilir ve benzer simptomlara neden olabildiği açıklanmıştır. Bununla birlikte, Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi'nin Dokuzuncu Raporuna göre viral proteinlerin herhangi birinde amino asit özdeşliğinde %10'luk bir fark, bir virüsün *Luteoviridae* familyası içinde ayrı bir tür olarak sınıflandırılması için bir kriterdir olduğu savunulmuştur (Dombrovsky vd. 2013).

Knierim vd. (2010) Tayvan'da kabakgillere bulaşan Polerovirüslerin genetik çeşitliliğini daha iyi anlamak için, 2008 ve 2009'da direnç tarama germplazmı amacıyla bir ön hazırlık olarak bir araştırma yapılmıştır. Sekiz ilde toplanan sararma simptomlarını gösteren 102 kabakgil örneğinden 29'u Polerovirüs grubu virüsleri tarafından enfekte edilmiş olarak tanımlanmıştır. RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp) geninin, intergenik bölgenin ve kılıf protein (CP) geninin bir kısmını kapsayan 1.4 kb PCR ürününün dizi

analizi, 29 örneğin 13'ünün varlığını ortaya koymuştur. Altı ülkeden (Hindistan, Endonezya, Mali, Filipinler, Tayland ve Tayvan) çeşitli sararma belirtileri gösteren biber (*Capsicum spp.*) örneklerinden ve Hindistan'dan *Solanum nigrum* RNA ekstraktları test edilmiştir. Genel Polerovirüs primer çiftleri ile numuneler, RNA'ya bağımlı RNA polimerazın (RdRp) 3' yarısını kılıf proteininin (CP) 5' yarısına uzanan beklenen 1.1 kb ve 1.4 kb ürünler elde etmişlerdir. Filogenetik analiz, dizilenen 13 izolatın hepsinin PeVYV (Türkiye), PYLCV-IS (İsrail) birlikte kümelendiğini göstermiştir. Virüsün geniş coğrafi dağılım gösterdiği vurgulanmıştır (Knierim vd. 2013).

Nyana vd. (2016) Bali'de kabakgiller bitkilerinde damarlarda sararma belirtileri tespit edilmiştir. Biberlerde de benzer belirtiler daha önce gözlemlenmiştir ve erken teşhis ile *Polerovirüs* enfeksiyonu olarak varsayılmıştır. PeVYV'nin spesifik primer çiftleri ile RT-PCR testi yapılmıştır. Nükleotid dizi analizi ile 650 bp'lik spesifik RNA fragmanları elde edilmiştir. Nükleotid sekans analizi, sekansın Endonezya (Bali ve Rembang) biberlerini enfekte eden *Pepper vein yellows virüsü* (PeVYV) ile %95'in üzerinde en yüksek benzerliğe sahip olduğunu göstermişlerdir.

Kamran vd. (2018) Suudi Arabistan'ın Riyad bölgesindeki farklı lokasyonlardan (Al-Aflaj, Al-Huta, Sajir, Shaqra ve Wadi Nisah) 2014-2016 bahar sezonlarında toplam 220 dolmalık biber örneği ve 116 adet yabancı otlardan toplanmıştır. Örnekleri karakterize etmek için, yaklaşık olarak ORF2'nin 3' ucundan ORF3'ün ortasına uzanan genomun daha büyük bir kısmı (-1.300 nt) amplifiye edilmiş ve dizilenmiştir. Genomun büyük kısmını dizilemek için yeni nesil sekanslama yapıp 5,496 nt dizilenmiştir. PeVYV'yi geçici olarak *Pepper leafroll chlorosis virus* (PeLRCV) olarak adlandırılmış yeni bir türe ait farklı bir polerovirüs izolatının varlığını ortaya çıkarmışlardır.

Ghosh vd. (2019) Polerovirüsler yalnızca yaprak bitleri tarafından taşındığı ve floem sınırlı RNA bitki virüsleri olduğu bilinmektedir. Birden fazla yaprak biti biberi enfekte ederek damar sararmasına, yaprak kıvrılmasına ve meyve renginin solmasına neden olduğu gözlemlenmiştir. Düşük yaprak biti popülasyonlarına rağmen, İsrail'deki birçok dolmalık biber alanlarında bu kadar şiddetli belirtilerin görüldüğü yeni bir salgın gözlemlenmiştir ve hastalığın ve böcek vektörünün yeniden araştırılması gerektiği düşünülmüştür. Burada, bu salgına yeni bir beyaz sineğin (*Bemisia tabaci*) *Pepper whitefly-borne vein yellows virus* (PeWBVYV) adını verilmiştir. PeWBVYV, genomun 5' uçun yarısında İsrail ve Yunanistan'dan *Pepper vein yellows virüsü*'ne (PeVYV) oldukça (>%95) homologken, 3' uçun yarısında *African eggplant yellows virüsü*'ne (AeYV) homolog olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma ile PeWBVYV, beyaz sinekle bulaşan bir Polerovirüsün ilk raporunu yayınlamışlardır.

2.2. Ülkemizde Yapılan Çalışmalar

Buzkan vd. (2013) 2011 yılında Türkiye ve Tunus'ta başlıca biberde rastlanan virüsleri araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda PVY ve CMV tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, polerovirüsler %70'in üstünde yaygınlık göstermiştir. Polerovirus cins primerleri kullanılarak RT-PCR yapılmış ve 1.1 kb'lik genom elde edilmiştir. Yapılan dizi analizleri sonucunda *Beet western yellows virüsü* (BWYV) ve PYLCV'yi olduğunu bildirmişlerdir. Hatay, Monastır, Kairouan ve Gabes (Tunus)'ten toplanan örnekler PVY, CMV, TEV, ToMV, PMMoV, TSWV'ye kendilerine özgü antiserum ve *Polerovirus* etmenlerine CABYV antiserumu kullanılarak DAS-ELISA yöntemiyle

araştırmışlardır. CABYV antiserumu ile pozitif tespit edilen örnekler RT-PCR yapılmıştır. Filogenetik analizler sonucunda; Gen bankasındaki benzerliklere bakıldığında etmenin isminin Biber sarı damar virüsü (*Pepper vein yellows virus*, PVYV) olarak değiştirilmesi gerektiği öngörülmüştür.

Zencirkıran (2014) Doğu Akdeniz Bölgesindeki biber alanlarında Biber sarı yaprak kıvrıcılık virüsü (*Pepper yellow leaf curl virus*, PYLCV)'nin yaygınlığının ve izolatların filogenetik akrabalık ilişkilerinin belirlemiştir. *Polerovirus* cinsine özgü primerler ile testlenmiş %16 oranında pozitif sonuç elde edilmiştir. Filogenetik analizler sonucunda; PYLCV'nin 350 nt uzunluğundaki bölgesi kullanılarak hazırlanmış ve İsrail izolatu ile yakın benzerlik tespit edilmiştir.

Ülkemizde bu virüs ile ilgili çok kısıtlı çalışma bulunmaktadır. Çalışmanın yapıldığı Antalya ilinde sadece Yunanistan'dan bir araştırmacının raporu mevcuttur. Son zamanlarda çiftçi şikayetlerinin artması ve yapılan arazi gözlemlerinde bu semptomların gözlemlenmesi çiftçi ve teknik personelin bu virüs hakkında bilgi sahibi olmadıkları göstermiştir. Virüsün ismi ve genetik yapısı ile ilgili olarak birbirinden farklı birçok rapor bulunmaktadır. Ülkemizden sadece kılıf protein bölgesine ait çok kısa nükleotid dizileri ile grup düzeyinde rapor edilen PeVYV'nin varlığı ve ismi ile ilgili karmaşanın ortadan kaldırılması amacıyla virüsün tüm genomu ve genetik özelliklerini belirlemek üzere bu çalışma planlanmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Çalışmalar, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalı Moleküler Viroloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. 2019-2020 yılları arasında Antalya ilinin doğusunda, merkezinde ve batısında bulunan biber üretim alanlarından toplanan biber örnekleri araştırma materyalini oluşturmuştur. Özellikle biber örneklerinin *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) ile enfekteli olduğunu tespit etmek için simptomatolojik inceleme yapılmıştır. PeVYV'nin belirtilerinde damarlarda sararma ve damarların yukarı doğru kıvrılması, yaprak boyutlarının küçülmesi, meyvelerde boyut küçülmesi ve renk değişikliği gibi simptomlara dayanarak örnekleme yapılmıştır. Araştırma materyalleri gerek arazi ortamında gerek ise viroloji laboratuvarında fotoğrafları çekilmiş ve biber örnekleri plastik torbalara konularak derin dondurucuda (-20°C) muhafaza edilmiştir.

PeVYV ile enfekteli örnekler üzerinden bitki özsuvarı elde edilmesinde steril plastik tüpler ve örnek ezme çubukları kullanılmıştır. Laboratuvar çalışmaları sırasında vortex cihazı (Vortex-GENE2), cam ve plastik malzemeler, hassas terazi, mikrodalga, çalkalayıcı ve otomatik pipet set kullanılmıştır.

Transmission elektron mikroskobunda virüs partiküllerinin görüntüsünü almak için Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesinden hizmet alımı yapılmıştır. Virüs partiküllerinin için karbon kaplı bakır 300 Mesh'lik Grid (Electron Microscopy Sciences®, the United Kingdom) kullanılmıştır.

Moleküler çalışmalarda Sentebiolab firmasından temin edilen oligonükleotidler kullanılmıştır. RT-PCR çalışmalarda Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, ABD) firmasından temin edilen Verso 1-step RT-PCR Reddymix kiti ve RLM-RACE kiti, 100 bp ve 1 kb DNA Ladder Marker ve BIO-RAD (United States and Canada) firmasının T100 Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır.

Elektroforez ve jel görüntülemelerinde Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, ABD) firmasının yatay elektroforez tankı, BioDocAnalyze firmasının güç kaynağı ve jel görüntüleme cihazı, Sigma firmasının Agaroza kimyasalı, Etidium bromide kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Simptomatolojik çalışmalar

2019-2020 yılları arasında Antalya ilinde yetiştirilen biberde gözlemlenen PeVYV hastalığının tanılanması ve saptanması amacıyla virüs ile bulaşık olduğu düşünülen biber ekim alanlarından örnekler alınmıştır. Öncelikle örtü altı içerisinde simptomatolojik gözlemler yapılmıştır. Simptomatolojik gözlemler sırasında virüs benzeri simptom gösteren örnekler toplanmıştır. Bu simptomlar; bitkide bodurluk, boğum aralarında kısılma, damarlar arası sararma ve damarların yukarı doğru kıvrılması, yaprak boyutlarının küçülmesi, meyvelerde boyut küçülmesi ve renk değişikliği gibi gözlenmektedir. Virüsün simptomlarına sahip olan biber bitkilerinden alınan örnekler

naylon poşetlere örnek numarası, yeri ve çeşidi yazılarak paketlenmiştir. Etiketleriyle birlikte fotoğrafları çekilmiş ve buz kutusu içinde laboratuvara getirilmiştir. Virüsün belirti gösteren örneklerinden bazıları Şekil 3.1.'de numaralandırılarak gösterilmiştir. Yapraklarda yukarı doğru kıvrılma, damarlar arası sararma, boyutlarının küçülmesi (2, 3, 4, 5); meyvelerde renk değişimi, boyut küçülmesi (2, 4, 6); bitkiler arasında gelişim farkı, bodurluk, boğumlarının kısalması (1) gözlenmiştir.



Şekil 3. 1. Toplanan örneklerde simptomatolojik incelemeler

3.2.2. Virüs saflaştırma ve TEM (Transmission electron microscopy)

Örneklere simptomatolojik incelemeler yapıldıktan sonra virüsün varlığını saptamak için elektron mikroskopundan görüntü almaya başvurulmuştur. Zeiss Leo 906 E TEM (Germany) cihazına virionların aktarılması için kullanılan metot Fidan ve arkadaşlarının (2020) önerdiği yöntem aşağıda belirtildiği gibi kullanılmıştır. Virionlar, 100 gr simptomatik biber bitkilerinden izole edilmiştir. Yapraklar, %3 (v / v) üre ve 200 µL tiyoglikolik asit içeren 200 mL 0.2 mol L – 1 potasyum fosfat, pH 7.6 olacak şekilde hazırlanmıştır ve 4 dakika karıştırıcıda homojenize edilmiştir. 10000 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüjlendikten sonra, süpernatant kısım toplanmıştır. Bu süpernatantın toplamı 10 uL ve 10 uL %1 fosfotungstik asit (Fluka analitik), bir formvar / carbon® membran ile kaplanmış 300 meshlik bakır ızgaralara (Electron Microscopy Sciences®, the United Kingdom) birlikte yerleştirilmiştir. Damlacıklar bir pipet kullanılarak karıştırılmış, 30 saniye bırakılmış ve fazla sıvı bir parça filtre kâğıdı ile çıkarılmıştır. Izgaralar, 120 kV'de çalıştırılan bir Zeiss Leo 906 E TEM (Germany) ile gözlenmiş ve fotoğraflanmıştır. Ölçeklendirmede bilinen boyutta bir standart kullanılmış ve viral partiküllerin boyutları hesaplanmıştır.

3.2.3. Moleküler Çalışmalar

3.2.3.1. RT-PCR çalışmaları ile tüm genom analizi çalışmaları

Toplanan örneklerden Total Nükleik Asit Ekstraksiyonu (TNA) yapılmıştır. TNA Fidan (2010)'nın önerdiği Dellaporta yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. (Kullanılan yöntem ve kimyasalların içeriği Ek 1 ve Ek 2'de verilmiştir). Moleküler çalışmalarda kullanılan tampon çözeltiler Ek 3'te verilmiştir.

Biber materyallerinden elde edilen nükleik asit ekstraktları RT-PCR çalışmalarında kullanılmıştır. RT-PCR çalışmaları sırasında hedef RNA'ların çoğaltılması amacıyla Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, ABD) firmasının Verso one-step RT-PCR Reddymix kit kimyasalları kullanılmıştır. BİO-RAD firmasına ait T100 Thermal Cycler aletinde gerekli kimyasallar, virüslere spesifik primerler ve izole edilen TNA kullanılarak 200 µl steril tüplerde çoğaltma işlemi tamamlanmıştır.

Öncelikle PeVYV'nin varlığını saptamak için Polerovirüs grup primerleri ve tür primerleri ile RT-PCR çalışmaları yapılmıştır. PeVYV'ye özgü tür ve grup primerler çiftleri, sentezlenecek molekül büyüklükleri Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. Çizelgede verilen primerlerin çalışmaları yapılmıştır. Kullanılacak malzemelerin miktarları Çizelge 3.2'te verilmiştir. RT-PCR protokolü Çizelge 3.3 de verilmiştir.

Çizelge 3. 1. PeVYV'nin grup ve tür primer çiftleri, bölgenin moleküler büyüklüğü

	Primer adı	Dizi (5'-3')	Amplikon Uzunluğu	Literatür
Grup Primeri	Gen1	CTCAARGCCTACCATGARTATAARATC	324 bp	Afouda vd. 2017
	Gen2	CGTCTACCTATTINGGRTTNTG		
	PoconF	TGYTCYGGTTTIGACTGG	1.4 kb	Afouda vd. 2017
	Gen2	CGTCTACCTATTINGGRTTNTG		
	PYDGroupUp	CAGAACAAGCGAGAAATCGCTC	240 bp	Lotos vd. 2017
Tür primeri	PYDGroupDown	TGTGAGTTTGTTCGGACGACC		
	PolGenUp2	GATGARGGTCGYTACCG	593 bp	Lotos vd. 2014
	PolGenDown2	ACCTCGACTTTTRAARCC		
	PeVYV-f	GAGAAAGACAACCTGTTAAACTCCA	629 bp	Murakami vd. 2017
	PeVYV-r	TCGTGAGTTTAGTACTATTCCTTCCT		
Tür primeri	PY-F3802	GGAGGAAGGTCRAGCAACAGC	403 bp	Dombrovsky vd. 2013
	PY-dR-4186-4205	TGGA AAAAYCCRGCGGCAAC		
	PY-F-3826-3846	ACTTTCATCTTCAACAAGGAC	389 bp	Dombrovsky vd. 2013
	PY-dR-4186-4205	TGGA AAAAYCCRGCGGCAAC		
	F1-PYLCV	GGAGGAAGGTCRAGCAACAGC	409 bp	Dombrovsky vd. 2010
	R2PYLCV	CTATTTGGGGTTGTGYARTTGCAC		

Çizelge 3. 2. Verso one-step RT-PCR yapımında kullanılan malzemeler

İçerik	Miktar
Distile su	10.5 µl
Verso 1-step RT-PCR Reddymix Master	25 µl
RT Enhancer	2.5 µl
Forward primer	1 µl
Reverse primer	1 µl
Verso Enzyme Mix	1 µl
Kalıp RNA	2 µl
Toplam Hacim	50 µl

Çizelge 3. 3. Verso one-step RT-PCR protokolü

	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	50 °C	15 dk	1 döngü
	95 °C	2 dk	
Denatürasyon	95 °C	30 sn	39 döngü
Annealing (Bağlanma)	50-60 °C	45 sn	
Extension (uzama)	72 °C	45 sn	
Final uzama	72 °C	7 dk	1 döngü

Tüm genomu tek parça ve tek RT-PCR ile çoğaltmak ve büyük parçaların dizi analizleri hizmetini almak hem zor hem de maliyetli olması nedeni ile genom parçalara ayrılarak çoğaltılmıştır. Genomun başlangıç ve son (5' ve 3') bölgelerine ait primerler ile yapılan RT-PCR sonucunda Sanger sekansı yapıldığında karmaşık sonuçlar elde edilmektedir. Bu karmaşıklığı düzeltmek ve daha temiz sonuçlar elde etmek için RLM-RACE kiti (Thermo Fisher Scientific) başlangıç ve son bölgenin çoğaltılmasında kullanılmıştır. RLM-RACE, cDNA'yı yalnızca tam uzunlukta mRNA'dan çoğaltmak için tasarlanmıştır ve genellikle PCR'den sonra tek bir bant üretir. mRNA'da tanımlanan bir

nokta ile 5' ucu arasındaki cDNA uçlarının (RACE) hızlı amplifikasyonu ve mRNA'nın 5' uç bilgisini elde etmek için uygundur.

PeVYV genomunun RT-PCR çalışmalarında daha sağlıklı sonuçlar elde edebilmek için tasarlanmış Lotos ve arkadaşlarının geliştirdikleri primer kombinasyonu kullanılmıştır (Lotos vd. 2017). Kullanılan primer dizimleri Çizelge 3.4 gösterilmiştir.

Çizelge 3. 4. Verso one-step RT-PCR çalışmalarında kullanılan primer çiftleri ve dizimleri (Lotos vd. 2017)

No.	Genom pozisyonu	Primer adı	Dizi (5'-3')	Amplikon Uzunluğu
1	1-198	P-5'Up P-198Down	ACA AAA TAT ACG AAG AGA GAG AG AAA GAA AAT GGT TTG TAG TCT C	198 bp
2	80-514	P-81 Up P-5RDown	TCT TAA AGT YTC CCT CAC TCG CAA GC GTC CAT ACG CGC AGG AAT CTT GAA AAC TC	435 bp
3	406-1044	TobV5UpNest P-1015Down	CCC ACC TTA AAA GAT GCG CTG GTT CTG C AGA GAT CAG AGG TGT GAA TAG GCG GAG TGG	639 bp
4	406-2871	TobV5UpNest TobVDown1	CCC ACC TTA AAA GAT GCG CTG GTT CTG C CCA TTCCGC AAC GCT CCA GTC AAA TCC	2466 bp
5	904-1892	P-904Up P-1893Down	GCC AGC TGT GTA CGG TTA TAT GAC GCT TTC TGG GCC ACT ACT TCC AC	989 bp
6	1786-2100	P-1786Up P-2100Down	CCC TCA AAG CTT CCA GAA TCA G GCT CAG GGT GTT CTT GGA TG	315 bp
7	1786-2734	P-1786Up P-2715 Down	CCC TCA AAG CTT CCA GAA TCA G GTA GAC AAG CCA AAA CCG GG	949 bp
8	2595-3187	PolGenUp2 PolGenDown2	GAT GAR GGT CGY TAC CG ACC TCG ACT TTR AAR CC	593 bp
9	2835-3960	PolGenUpNest PolGenCpDown	GAY TGC TCH GGT TTY GAY TGG GAT YTT ATA YTC ATG GTA GGC YTT GAG	1126 bp
10	3699-4260	1498Up PolGenP5Down	ACG CCC ACG ACA GGT TCG GBC GYC TAC CTA TTT NGG	562 bp
11	3803-4539	P-3805 Up P-4536Down	ATA GAG TTG GAG GAC GGT CGA G CTT TCC TTT GTC TGC CGG GAT G	737 bp
12	3803-5935	P-3805 Up P-5777 Down	ATA GAG TTG GAG GAC GGT CGA G AGA CTR CCT GGG TTA TAC TCT AAC AG	2133 bp
13	4422-5222	P-4419Up P-5219Down	TTC GAT GTA TAA GTG GGA AGA TGA G TTG TCA TAC TCG AGT TGC TGC	801 bp
14	5105-5935	P-5102Up P-5777 Down	CTC CGG ATG TGT CAG ATG ATG AGA CTR CCT GGG TTA TAC TCT AAC AG	831 bp
15	5813-6091	P-5810/3RUp P-3'Down2	GAA GAG GGT GAC AGT CCG AGC TCA AGG ACA TCA TAG ACC AGG GGG GGG TAT C	279 bp

Tüm genom primerlerinin RT-PCR içerikleri ve RT-PCR protokolleri Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.4'te ki gibidir. Ancak bağlanma sıcaklığı primerlere göre değiştiği için genom primerlerinde 52– 64 °C'ler arasında kullanılmıştır.

RT-PCR çalışmaları yapılmış olup elde edilen RT-PCR ürünleri %1,5'lik agaroz jelde yürütülmüş ethidium bromide ile boyandıktan sonra Biometra jel görüntüleme cihazında UV altında görüntülenerek kaydedilmiştir. Agaroz jel elektroforez yöntemi Ek 4'te verilmiştir.

3.2.3.2. Sanger metodu ile dizi analizi ve filogenetik çalışmalar

PeVYV'nin tüm genomun moleküler analizinin ve soy ağacının oluşturulması aşamasında elde edilen RT-PCR ürünlerinin doğrudan genoma ait dizi analizleri yapılmıştır bunun için; RT-PCR'da 50 µl hacimde çalışılarak 10 µl'lik hacmi jelde yürütülmüş 40 µl'lik kalan kısmı MadSanTek firmasına dizi analizi hizmeti almak için gönderilmiştir. Sekans sonucunda elde edilen veriler CHROMAS v.2.6.4 (Technelysium Pty. Ltd.) ve Mega7 (Kumar vd. 2011) programları kullanılarak düzenlenmiştir. CHROMAS programı ile tek yönlü çalışılan sekans ürünlerin forward ve reverse dizilerinin baş ve son kısımlarındaki okuma kirlilikleri silinmiştir. Daha sonra her bir primere ait olan tek bir eklemeli düzenlenmiş (contig) sekans elde edildiği CHROMAS programında okuma doğrulanmış ve gerekli kaymalar düzeltilmiştir. Tüm sekanslar CHROMAS programında birleştirilerek PeVYV'nin tüm genomuna ait tek bir dizi elde edilmiştir. PeVYV'ye ait tek bir dizilim elde edildikten sonra NCBI (National Center for Biotechnology Information)'da BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) yapılarak PeVYV izolatının dünyadaki kayıtlar ile benzerlik oranları belirlenmiş ve en yakın hangi izolat ile ilişki kurduğu araştırılmıştır. Çalışmaya ait olan tüm alignment ve filogenetik analizler MEGA7 programı ile yapılmıştır. ExPASy programı kullanılarak açık okuma bölgelerinin (ORF) protein dizilimleri belirlenmiştir. PeVYV izolatının NCBI'a kaydı yapılmıştır.

4. BULGULAR

Yürütülen tez çalışması, Antalya ilinde bulunan bazı biber seralarından Biber damar sarılık virüs'üne (PeVYV) benzer örnekler alınıp simptomatolojik olarak incelenmiştir. Transmission elektron mikroskopu ile virüs partiküllerinin görüntüsü elde edilmiştir. Virüs benzeri semptom gösteren örnekler moleküler analizlere tabi tutulmuştur. Tür ve genom primerleriyle tespit edilen virüs izolatlarının Sanger Sekanslama metoduyla genom dizileri belirlenmiştir. PeVYV'nin dizi analizleri sonucunda elde edilen veriler, filogenetik analizler ile dünya genelinde rapor edilen izolatlar ile karşılaştırılmıştır. PeVYV izolatı NCBI'a kaydedilmiştir.

4.1. Simptomatolojik Bulgular

Biber seralarından alınan örneklerde; bitkide bodurluk, boğum aralarında kısılma, damarlar arası sararma, damarların yukarı doğru kıvrılması, yaprak boyutlarının küçülmesi, meyvelerde boyut küçülmesi, şekil bozukluğu ve renk değişikliği gibi gözlenmiştir. Semptomlar Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3 da verilmiştir. Bu simptomatolojik belirtiler çinko (Zn), magnezyum (Mg), bakır (Cu) vb. besin elementler eksikliği ile çok benzerlik göstermektedir. Besin elementi eksikliği gibi tüm bitkilerde görülmemesi ve sera içerisinde rastgele dağılmış olması nedeniyle biyotik faktörlerden birinin etkisi olabileceği kaanatini doğurmuştur. Özellikle Şekil 4.2. a ve b çinko besin elementi eksikliğine çok benzemektedir.

Örtü altı içerisinde yapılan incelemelerde PeVYV'nin en çok gözlemlendiği bölgeler yaprak bitlerinin yoğun bulunduğu sera kenarları ve sıralarının başındaki bitkilerde yoğun bir şekilde görülmüştür. Örtü altı yetiştiricilikte polikültür yetiştiricilik yapılan alanlarda (domates, biber, patlıcan, hıyar) PeVYV semptomları sadece biberde gözlemlenmiştir. Semptom gösteren meyveler incelendiğinde tohumlarında herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Şekil 4.3, c). Simptomatolojik olarak PeVYV'ye benzer örnekler yapılan RT-PCR testleri sonucunda pozitif bulunmuştur.



Şekil 4. 1. a) PeVYV'nin biber bitkilerindeki simptomlarına sera içerisinde genel bakış; **b, c)** Biber bitkilerinde bodurluk ve boğum aralarında kısalma gibi simptomatolojik görüntüler



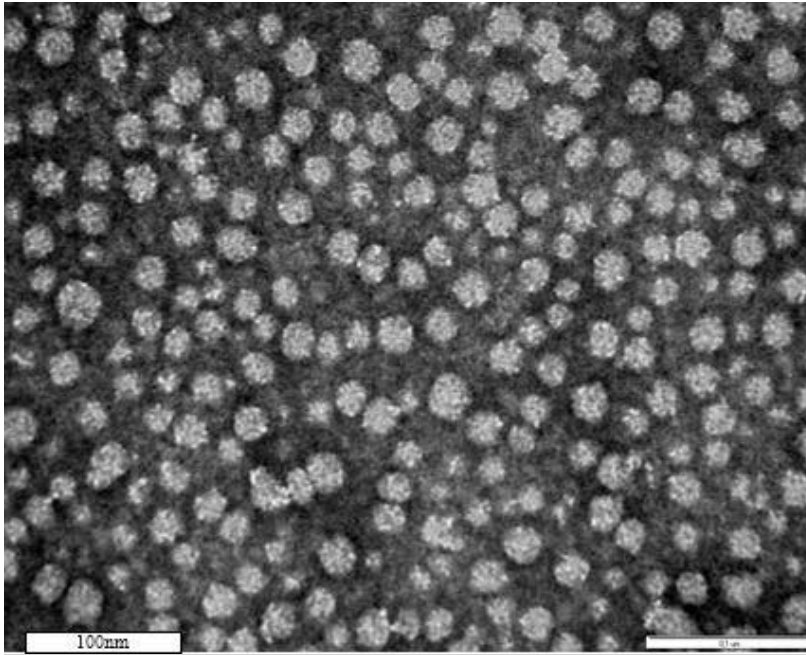
Şekil 4. 2. a, b) PeVYV'nin biber bitkilerindeki yaprak simptomlarına sera koşullarında genel bakış; **c, d, e)** Damarlar arası sararma, damarların yukarı doğru kıvrılması, yaprak boyutlarının küçülmesi ve yapraklarda şekil bozukluğu simptomları



Şekil 4. 3. a) PeVYV ile enfekteli biber meyveleri ile sağlıklı meyvenin kıyaslanması; **b)** PeVYV'nin yaprak ve meyve belirtileri, **c)** PeVYV ile enfekteli meyvenin boyuna kesiti

4.2. Virüs Saflaştırma ve TEM (Transmission electron microscopy) Bulguları

PeVYV, Luteoviridae familyası Polerovirüs cinsinin üyesi olup yaklaşık 25 nm'lik bir ikosaedral simetriye sahip tek sarmallı (ss) pozitif duyarlı RNA virüs olduğu 1995 yılında tespit edilmiştir (Yonaha vd. 1995). Bu verilere dayanarak 100 gr simptomatik biber bitkilerinden alınan virionlar karbon kaplı bakır 300 mesh'lik Grid (Electron Microscopy Sciences®, the United Kingdom) ile taranmıştır. Görüntüleme için hem taze yapraktan hem de -20 °C'de muhafaza edilen örneklerden incelenme yapılmıştır. Taze yapraktan alınan örneklerde virüs partiküllerinin korunduğu daha başarılı bir şekilde görülmüştür ve 25 nm'lik bazı küresel parçacıklar fotoğraflanmıştır. Şekil 4.4 de gösterilmektedir.



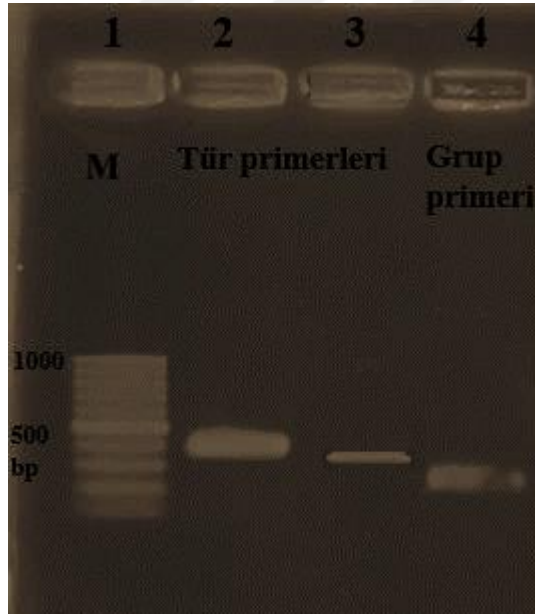
Şekil 4. 4. PeVYV'nin kısmen saflaştırılmış virionlarının görüntüsü

4.3. Moleküler Bulgular

4.3.1. RT-PCR çalışmaları ile tüm genom analizi bulguları

Moleküler çalışmalar amacıyla virüs benzeri belirtiler gösteren örnekler -20°C’de muhafaza edilmiştir. Bu örneklerin moleküler çalışmalarda kullanılabilmesi için total nükleik asit ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen nükleik asitler ikişer tekrarlı olarak -20°C’de steril tüplerde muhafaza edilmiştir. RT-PCR çalışmaları sırasında -20°C’de ki nükleik asitler kullanılmıştır.

RT-PCR çalışmalarında PeVYV’nin tür ve grup primerleri (Çizelge 3.1) kullanılarak örneklerin enfekteli olma durumlarını tespit etmek için çalışmalar yapılmıştır. Kullanılan tür primerleri içerisinde en etkili sonuç veren primerler; PY-F3802-PY-dR-4186-4205 ve PY-F-3826-3846-PY-dR-4186-4205 dir. Şekil 4.5’te 2 numaralı tür primer PY-F3802-PY-dR-4186-4205’ tir ve 403 bp uzunluktadır. 3 numaralı primer PY-F-3826-3846-PY-dR-4186-4205’tir ve 389 bp uzunluktadır. Kullanılan grup primerleri içerisinde en etkili sonuç veren primerler; PYDGroupUp-PYDGroupDown’dır ve 4 numaralı grup primeri 240 bp uzunluğundadır. Yapılan tüm RT-PCR çalışmaları sonucunda örnekler pozitif tespit edilmiştir. Fakat diğer tür ve grup primerlerin RT-PCR aşamasında çalışmasına rağmen net görüntü şekil 4.5’teki üç primer de elde edilmiştir. Ülkemizde son yıllarda bu virüs hastalığı ile ilgili çalışma yapılmamasından dolayı pozitif kontrol optimizasyonu yapılamamıştır. Pozitif çıkan RT-PCR ürünleri dizi analizi işlemleri için Sanger sekans hizmeti alımı yapılmıştır.

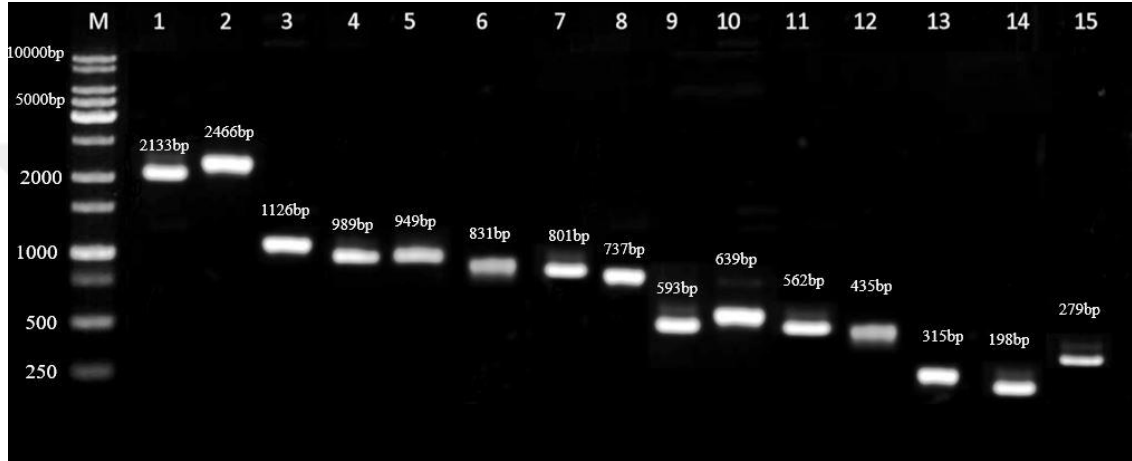


Şekil 4. 5. PeVYV’nin tür ve grup primerleriyle yapılan RT-PCR optimizasyonu

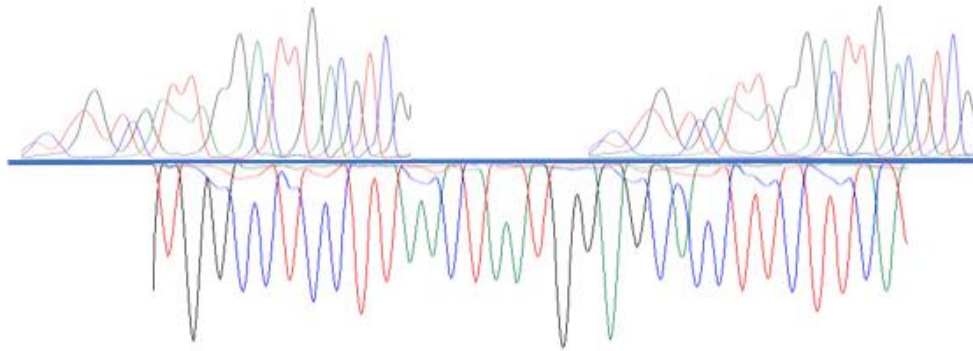
PeVYV tespit edildikten sonra pozitif bitki materyalleri tüm genom çalışmaları için kullanılmıştır. Tüm genom çalışmalarında primer kombinasyonunun fazla olması nedeni ile farklı annealing sıcaklığına sahip primerler kullanılmıştır (Çizelge 3.4). Bu amaçla gradient RT-PCR yapılarak her bir primer çifti için en iyi bağlanma sıcaklıkları

belirlenmiştir. Tüm optimizasyonlar yapılarak tüm genom çoğaltıldıktan sonra şekil 4.6'da ki jel görüntüsü ile yaklaşık 6,1 kblik alanın RT-PCRları başarıyla gerçekleştirilmiştir.

Primerler birbirine geçmeli şekilde seçilmiştir. 1 nolu primer çifti 1 – 198. konumu çoğaltırken 2 nolu primer 80. nolu konumdan başlamaktadır. 80 ile 198. konum arasındaki bölge iki kez çoğaltılmıştır. Böylece Sanger sekanslamada olabilecek yanlış okumaların düzeltilmesi hedeflenmiştir. Tüm primerler iç içe geçmiş primer olarak tasarlanmış olup ikinci primer 514. konumda biterken üçüncü primer 406. konumda başlayıp 406. ile 514. konum arası denk getirilerek temiz sekanslar ile karşılaştırılmıştır. Forward ve reverse primerlerinin olduğu bölgelerdeki kirli piklerin doğrulaması için takip eden primer çiftinde bu bölge ortaya alınarak temiz pikler elde edilip doğrulanmıştır.



Şekil 4. 6. PeVYV'ye özgü tüm genom primerleri kullanılarak elde edilen RT-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü



Şekil 4. 7. Genom primerlerinin hizalanması

4.3.2. Sanger metodu ile dizi analizi ve filogenetik çalışmalar

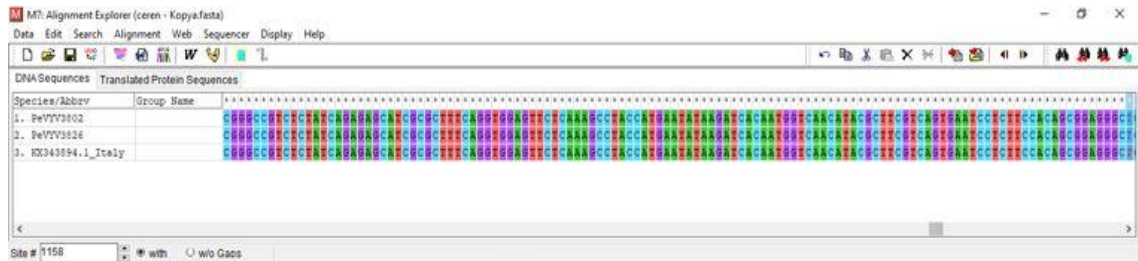
PeVYV'nin tüm genomun moleküler analizinin ve soy ağacının oluşturulması aşamasında elde edilen RT-PCR ürünlerinin doğrudan genoma ait dizi analizleri yapılmıştır bunun için; RT-PCR'da 50 µl hacimde çalışarak 10 µl'lik hacmi agaroz jele yüklenerek görüntülenmiştir 40 µl'lik kalan kısmı dizi analizi hizmeti almak için gönderilmiştir.

Öncelikle çalışmaların doğruluğu ve güvenilirliği açısından tür ve genom primerleriyle testlenen örneklerden pozitif çıkan ürünler tek yön dizi analizine gönderilmiştir. Elde edilen sonuçlar Chromas programı kullanılarak RNA dizi düzenlemesi yapılmıştır. Dizinin başlangıç ve son kısımlarındaki düzensiz nükleotitler arındırılmıştır (Şekil 4.8).

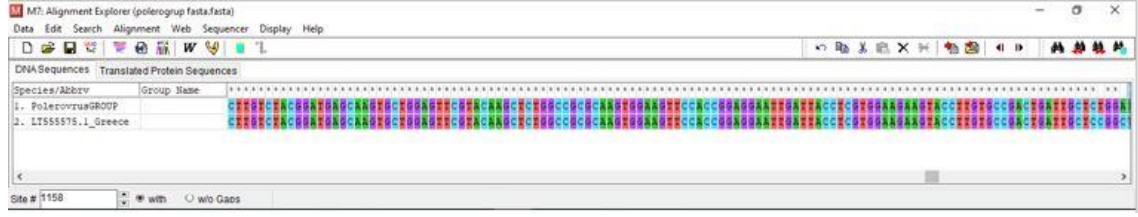


Şekil 4. 8. PeVYV'nin pozitif örneklerine ait sekans analizinin Chromas programındaki görüntüsü

PeVYV izolatının PY-F3802 ve PY-dR-4186-4205, PY-F-3826-3846 ve PY-dR-4186-4205 tür primerlerine ait sekans verileri ve PYDGroupUp-Down grup primerlerine ait sekans verileri Chromas programında düzenlenip temiz pikler elde edildikten sonra NCBI veri tabanında blast sekmesi kullanılarak izolatlar tek tek taranmış; İtalya izolatı ile %100 oranında benzer bulunmuştur (Accession no. KX343894.1). Mega 7 programı ile PeVYV izolatı ve İtalya izolatı kıyaslama yapılmıştır ve elimizdeki izolatların PeVYV'ye ait olduğu belirlenmiştir. (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10)



Şekil 4. 9. PeVYV izolatının tür primerine spesifik PY-F3802 ve PY-F-3826-3846 primerlerine ait sekansların karşılaştırılması



Şekil 4. 10. PeVYV izolatının grup primerine spesifik PYDGroupUp-Down primerlerine ait sekansların karşılaştırılması

Elimizdeki izolatların PeVYV'e ait olduğu tespit edildikten sonra PeVYV'nin tüm genom elde edilmek için Çizelge 3.4'te ki primerler ile RT-PCR çalışmaları sonucunda dizi analizleri yapılmıştır. Tüm genom için iç içe geçmiş primer kullanılmıştır. Dizi analiz sonuçları geldiğinde Chromas programı ile sekansın baş ve son kısımdaki kirlilikler silinmiştir ve sekanslar birbirleri ile karşılaştırılarak temiz diziler elde edilmiştir. Sekansları temizlendikten sonra NCBI'da karşılaştırmalar yapılmıştır. Tüm genoma eklendikten sonra tekrar aynı işlem yapılmıştır. İç içe geçmiş primerler çıkarılmış nükleotit dizilimleri birleştirilerek 6033 bp'lik genom oluşturulmuştur. NCBI veri tabanına kaydedilmek üzere PeVYVAnt01 olarak isimlendirilmiş ve MT127783.1 GenBank numarası ile kaydı yapılmıştır.

4.3.2.1. PeVYV'nin ORF bölgeleri ve tüm genom dizilemesi

15 parçalı olarak birbirine geçmeli bir şekilde elde edilen veriler ile gerekli düzenlemeler yapılmıştır. Primerlerin ortak çoğalttıkları bölgelerden temiz ve doğru pikler alınarak yaklaşık 6.1 kb'lik bölgenin sekansı elde edilmiştir. Ayrıca RLM-RACE ile başlangıçtaki UTR (Untranslation Region) (anamlı bir okuma oluşturmeyen bölge) yaklaşık 51 bp'lik bölgenin sekansı ile birleştirilmiş ve 6033bp'lik tüm genom elde edilmiştir. Elde edilen tüm genom bilgilerinin nükleotid dizilimleri paylaşılarak 6 adet ORF (Open Reading Frame – Açık Okuma Alanları) anlamlı bölgeler renklendirilerek gösterilmiştir. Çoğu ORF bölgeleri birbirleriyle çakıştığı için farklı renklere boyanmıştır.

ORF 0	51..800 "P0 protein"
ORF 1	175..2148 "P1 protein"
ORF 2	1638..3440 "P2 protein"
ORF 3	3640..4257 "Coat protein"
ORF 4	3668..4138 "Movement protein"
ORF 5	4258..5856 "P5 protein"

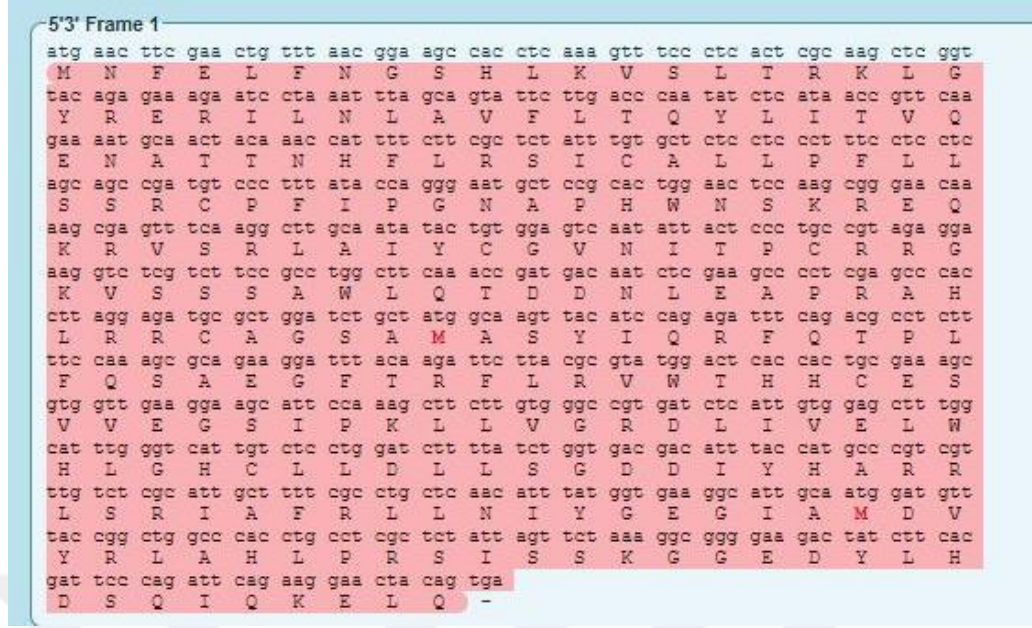
1	acgacctttg	gtaagagaga	gagcccttgc	tagtgatttc	ttcaagtttt	atgaacttgc
61	aactgtttta	cggaagccac	ctcaaagttt	ccctcactcg	caagctcggg	tacagagaaa
121	gaatcctaaa	tttagcagta	ttcttgaccc	aatatctcat	aaccgttcaa	gaaaatgcaa
181	ctacaaacca	ttttcttgc	tctatttctg	ctctcctccc	tttctcctcc	agcagccgat
241	gtccctttat	accagggat	gctccgcact	ggaactccaa	gcgggaacaa	aagcgagttt
301	caaggcttgc	aatatactgt	ggagtcaata	ttactccctg	ccgtagagga	aaggctctcg
361	cttcgcctcg	gcttcaaacc	gatgacaatc	togaagcccc	tgcagccccc	cttaggagat
421	gcgctggatc	tgctatggca	agttacatcc	agagatttca	gacgcctctt	ttccaaagcg
481	cagaaggatt	tacaagattc	ttacgcgtat	ggactcacca	ctgcgaaaag	gtggttgaag
541	gaagcattcc	aaagcttctt	gtgggcccgt	atctcattgt	ggagcttttg	catttggggtc
601	attgtctcct	ggatctttta	tctgggtgac	acatttacca	tgcccgtcgt	ttgtctcgca
661	ttgcttttgc	cctgctcaac	atttatgggt	aaggcattgc	aatggatgtt	taccggctcg
721	cccacctgcc	tcgctctatt	agttctaaag	gcggggaaga	ctatcttcac	gattcccaga
781	ttcagaagga	actacagtga	agagaaacaa	gttaagggat	ttatatcttt	gaaaatcccc
841	cagagccccc	cccgtggaag	cgtgctactc	gtgcaacatg	aagataatac	tcagtccggg
901	tatgccagct	gtgtacgggt	gtttgacggc	acttttagccc	tcagtacctg	tcaccacgtg
961	ggcacagggg	ttcccggagg	aaaggtgacc	tccacgaaaa	cacctaaaca	gataccactc
1021	cgctatttca	cacctctgat	ctcttcagaa	aaaggagatt	tcagtgttaat	gagcgggccc
1081	ccaaactggg	agagcctgct	aggctgtaaa	ggagcccaat	tcgttcccgc	atcacaactt
1141	gctaaatcta	agatgcgggt	ctttttcatt	gagaagaacg	agtggatggc	tgatcacggg
1201	gagattgtag	gtccacgtga	tcactgggtt	gctacgacgc	tctgcaactc	agagcctgga
1261	cactctggca	ccccgatttt	taatggcaaa	accatagtgg	gtgtgcacgc	tggaggtgag
1321	aatgaacaaa	actttaatgt	aatgacaacg	attcctcccc	tccccggttt	aacggcccc
1381	cagtattgtc	ttgaaactac	tgctcctcag	ggctcgagtct	tcactgatga	ggacttaagc
1441	gagatgatga	agagcgtcaa	atcgtatccc	cagttggaaa	agtttaaaa	ccccactggg
1501	aagaactggg	cagattaccc	cgaggacgaa	gatttctctg	cggaagtcaa	aagcagaccc
1561	gccccagcac	ctgtagccca	agaagctaaa	cccaagagtg	gtgctgatga	agctccgcgc
1621	gtgaacaaat	cccggcaatg	gtatccacgt	cttcccagag	cgggaaacga	gaaaggcaga
1681	gctgcctgoc	aaacccacag	caacccctgc	ccgcacacag	agaagggcaa	ggagaagaag
1741	gttagaggcc	aaaaggcccc	cgcctcgccc	acccctccaa	agcttccaga	atcagccgac
1801	ggcggcgaaa	aatattttaga	gaagctttta	gagaagctag	tggagaggtg	cgacctttcc
1861	actatagaaa	agaaagtggg	ggaagttagt	gcacagaaa	ccatgaagaa	accccaggaa
1921	aaccagcgcc	gcagacgacc	gcgggagaat	tccaaacgata	cttogaagga	agctacaaa
1981	gggagatacc	aacctcccaa	caagagatcc	cagggttcca	acaatgcgga	agcctccccc
2041	agtaactaca	cccaaagcaa	atcaaaggta	gcgagtgggg	caccacagctc	atccaaaaac
2101	atcctgagct	gggagagaaa	gtttccggct	tgggttgccc	aacagttagc	ccccaaagctg
2161	aggtgacctc	tctcacttta	caagcagaga	gggtggctgca	acgcgcgcag	tcagctaaaa
2221	tccatcatc	tgaggacagg	gagcgcgtta	tcaataaaac	tgtggaggcc	tactctaata
2281	tcaaaacttt	tggccccaca	gctactagag	ggaacaagct	cgagtggcgg	caatttctgg
2341	aagattttta	gtcagccgtc	ttttctctgg	agcttgatgc	aggtataggc	gtgccatata
2401	tcgcctatgg	aaggcccaat	cacaaagggt	gggtggaaga	cccgaacttc	ctgccagtgc
2461	tcgctcgact	cactttcaac	cgtttacaga	agatgttgga	agtcgagtcc	tctgatatga
2521	gcgctgaaga	gcttgtgcaa	gctggctctc	gtgatccatt	aaggacgttt	gttaagagag
2581	aaccacacaa	gcaatccaaa	ctcgatgaag	gtcgctaccg	cctcatcatg	agtgtttccc
2641	tagtagatca	attggtggcc	cgggttctgt	ttcagaatca	gaataagcga	gaaatcgctc
2701	tttgaggggc	aaatccctca	aaacccgggt	ttggcttgct	cacggatgag	caagtgtcgg
2761	agtttgtaga	agctctggcc	gcgcaagtgg	aagtttcacc	tgaggagtgg	attacctcgt
2821	ggaagaagta	ccttgtggcc	actgattgct	ctggctttga	ctggagcgtt	gcggaatgga
2881	tgctacacga	cgatatgggc	gtccgcaaca	aactcacact	ggacttaaac	cctacaacag
2941	agaagctgcg	atctgcgtgg	ctaaaatgca	tatgcaatag	tgctcgtgtg	ttgagcgatg
3001	gcacactcct	cgcccaaagg	gtccccggcg	ttcaaaaagtc	cggcagctac	aacacaagta
3061	gctcaaatcc	aaggatccga	gttatggccc	cctaccactg	tggggctgac	tgggccatgg
3121	cgatgggaga	tgatgccttc	gaatcagtc	acaccaacct	ggaggtgtat	aaaagtctag
3181	gttttcaaag	cgaggtttca	ggacaactgg	aattctgctc	tcatactctt	agagcgcctg
3241	acctgcacct	cccgtgaat	gagcgcaaaa	tgctgtacaa	gctcatattt	ggatataacc
3301	cggggtgtgg	gaatctggag	gtgatagcaa	attatattgc	cgctgtgtga	tcggttctga
3361	atgaattgcg	gcattgacca	gattctgttg	ctctccttta	cacgtggctg	gtctctccag
3421	tgctgccaca	aaataattga	agagagagca	tataactagc	caagcataca	tcagttgcaa
3481	gcgttggaag	gttacagtct	gactaccaac	agcctgacac	aatagattat	aaatttttag


```

3541 caggattttgc gtctggatttt ctttccgcaa tcccactttc tgtagcaggc atttacttag
3601 tctaccttaa aatctcagcc cactgttcgc cgatcgtaa tgaatacga aggggttagg
3661 agaaataatg gaaatggtgg atcacgcagc acccgccgtc gtagacgccc acgacaggtt
3721 cgccctgtcg ttgtggtcgc accccctggg cgcacacggc gaggaaatcg aagacgacga
3781 aatggaggca ggaaccgaag aagccgaaat agagttggag gaaggtcgag caacagcgaa
3841 actttcatct tcaacaagga ctcaatcaag gatagtctct caggatctgt caccttcggg
3901 cgtctcttat cagagagcat cgcgctttca ggtggagtto tcaaagccta ccatgaatat
3961 aagatcacaa tgggtcaacat acgcttcgtc agtgaatcct cttccacagc ggagggtctc
4021 atcgcttacg agctggaccc ccactgcaag cttactagtc tccaatccac cctgcgtaaa
4081 ttccccgtca ccaaaggcgg gcaagcgact ttctgggctt cgcagattaa cggggttag
4141 tggcatgata catccgaaga tcaatttagg ctgctctaca aaggaaatgg aacgaagaac
4201 gttgcgcgcg gtttcttcca gatccgggtt actgtgcaat tacacaaccc gaaatagatg
4261 tacaagtggg aagatgagaa gtgggacaaa gtcaacctcc aagctggtta ttctcgaat
4321 gaccggcggt gtatggaaac atacctcacc atcccagcag acaaaggaaa atttcatgtc
4381 tatcttgaag ctgatgggtga atttgctggt aagcatattg gcggcgattt ggacggtagt
4441 tggcttggca acattgccta tgatgtctct caacgaggtt ggacaatagg gaactacaaa
4501 gggttgaataa taaagaactt tcaaacgaat acaacctttg tggcggggca cccggatgct
4561 aagatgaatg gcaaaacttt tgacagcgcc cgggcagtag aggtagattg gttcgtctcc
4621 ttcgaactag aatgtgatga tgaagaggga agttggatga tttatcccc tccaatccaa
4681 aaagatgcct cttataatta caccgtttca tatggttaatt atacggagaa gtattgtgaa
4741 tggggagcca tatctgtttc aattgatgaa gataatgagg ggtacgcacc aagaagaata
4801 ccacgcaagg gggaaatggc gtggtcagat ccggagaagg attactccga agacaaaacc
4861 cagaaggaaa actggaacac tgaaccctg gacacaggta aatagatcg agaaagacaa
4921 ctctgttaaaa ctccatctcc ggatgtctct gattctgggt cagagctcgg ggcagatccc
4981 atacctcagg atctgatcga taaggttaac aagggagaag cactggaccc tatgcaacaa
5041 cttgaatatg ataagtatag gtttcaggaa aatatcatcg aactcagtga atcacaagat
5101 caaactctcg agtaccocaa gcttcccccc cccgtccac acaagccgct tccctcaggt
5161 agaactgaaa agtattttaa acctagtgtc gaccttttg aggcctggga taaagatcad
5221 ttcaaccctg gttatactaa ggaagaagtg gccgcggcta caataatctc tcacggttct
5281 atagccgatg ggagagacgc tttggaagaa agagataaca agatccaacg agcccaggtt
5341 tcgtggtctc atgataagtc aacgacaagt ccttccatag cttaaattaag agaaaagacc
5401 cttgaaaaga aagctttatc tagtgggtct ttgagacggg gttctgaagc cgcttcctct
5461 ttaggaggtg gttctataac tgggtgtacc ttaaagccaa agaagacaat tgaggaggaa
5521 atagtttcca aacttacgac aactcaaagg cttaggtagt agcaactcaa agctcggaat
5581 cagacggctg cgaacaacta tttgtgggtc gtcgaggttc ctcttgaaaa accacctggt
5641 ccttctcaat ttaaaggacg gtctcagctc taggacttta aactctgtga gcgtgattca
5701 tagtctaagc tctatgacta taaaacaacg agcatactga actccaagcc tgtagagta
5761 taaccagggc agtctaagct ctatgacttt aaaataacga gcacactgaa ctccaagcct
5821 gttagagtat aaccagggca gtctaagctc tatgacttta aaataacgag catactgaac
5881 tccaagcctg ttagagtata acccaggtcg tcgttagctg tagacgtaaa accagcggtc
5941 cgggtgtgat ggctgttaga cactgagtaa ctacagcaa cgaaaccctg agaaagatct
6001 acgcgggagt aggcatacata attcttaggg tag

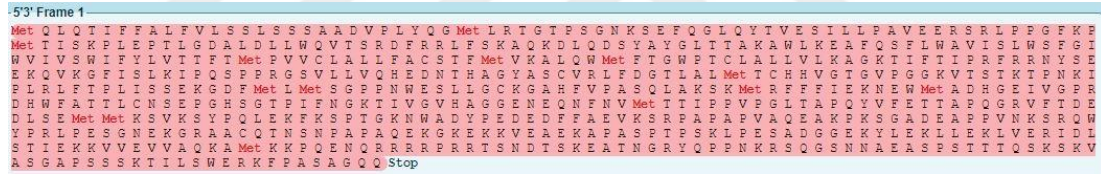
```

Elde edilen tüm genom sekansının, ExPASy programı aracılığı ile protein dizilimleri elde edilmiştir. Tüm genom üzerinde protein dizilimlerini belirlemek için anlamlı bölgeye (ORF) denk gelen 5'3' yönü açık okuma bölgesi 1 üzerinde protein dizilimleri oluşturulmuştur.

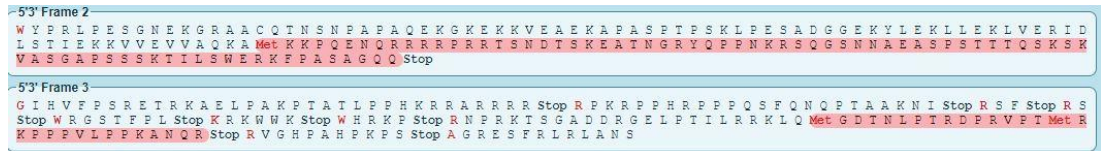


Şekil 4. 11. PeVYVAnt01 izolatının P0 proteinine ait açık okuma bölgeleri (ORF0)

ORF 0, 750 nt, 250 amino asitten oluşmaktadır. Metiyonin ile başlayıp TGA stop kodonu ile biten P0 proteinini meydana getirmektedir (Şekil 4.11).



Şekil 4. 12. PeVYVAnt01 izolatının P1 proteinine ait açık okuma bölgeleri (ORF1)



Şekil 4. 13. PeVYVAnt01 izolatının P2 proteinine ait açık okuma bölgeleri (ORF2)

ORF 1, 1974 nt, 658 amino asitten oluşmaktadır. Metiyonin ile başlayıp TAG stop kodonu ile biten P1 proteinin oluşturmaktadır (Şekil 4.12). ORF 2 1803 nükleotitten oluşmaktadır. ORF bölgesinde -2 ve -3 frame shift olarak okuma yapılmıştır ve Şekil 4.13 de gösterildiği gibi farklı iki anlamlı protein bölgesi elde edilmiştir. ORF1 ve ORF 2 bölgeleri RNA'ya bağımlı RNA polimeraz proteinini (RdRp) oluşturmaktadır. PeVYV'nin genomik RNA kalıbından yeni nükleik asid moleküllerinin sentezinin gerçekleşmesini sağlamaktadır.

5'3' Frame 1

atg	aat	acg	gaa	ggg	gtt	agg	aga	aat	aat	gga	aat	ggt	gga	tca	cgc	agc	acc	cgc	cgt
M	N	T	E	G	V	R	R	N	N	G	N	G	G	S	R	S	T	R	R
cgt	aga	cgc	cca	cga	cag	gtt	cgc	cct	gtc	gtt	gtg	gtc	gca	ccc	cct	ggg	cgc	aca	cgg
R	R	R	P	R	Q	V	R	P	V	V	V	V	A	P	P	G	R	T	R
cga	gga	aat	cga	aga	cga	cga	aat	gga	ggc	agg	aac	cga	aga	agc	cga	aat	aga	gtt	gga
R	G	N	R	R	R	R	N	G	G	R	N	R	R	S	R	N	R	V	G
gga	agg	tgc	agc	aac	agc	gaa	act	ttc	atc	ttc	aac	aag	gac	tca	atc	aag	gat	agt	tcc
G	R	S	S	N	S	E	T	F	I	F	N	K	D	S	I	K	D	S	S
tca	gga	tct	gtc	acc	ttc	ggg	cgc	tct	cta	tca	gag	agc	atc	gcg	ctt	tca	ggg	gga	gtt
S	G	S	V	T	F	G	P	S	L	S	E	S	I	A	L	S	G	G	V
ctc	aaa	gcc	tac	cat	gaa	tat	aag	atc	aca	atg	gtc	aac	ata	cgc	ttc	gtc	agt	gaa	tcc
L	K	A	Y	H	E	Y	K	I	T	M	V	N	I	R	F	V	S	E	S
tct	tcc	aca	gcg	gag	ggc	tcc	atc	gct	tac	gag	ctg	gac	ccc	cac	tgc	aag	ctt	act	agt
S	S	T	A	E	G	S	I	A	Y	E	L	D	P	H	C	K	L	T	S
ctc	caa	tcc	acc	ctg	cgt	aaa	ttc	ccc	gtc	acc	aaa	ggc	ggg	caa	gcg	act	ttt	cgg	gct
L	Q	S	T	L	R	K	F	P	V	T	K	G	G	Q	A	T	F	R	A
tgc	cag	att	aac	ggg	gta	gag	tgg	cat	gat	aca	tcc	gaa	gat	caa	ttt	agg	ctg	ctc	tac
S	Q	I	N	G	V	E	W	H	D	T	S	E	D	Q	F	R	L	L	Y
aaa	gga	aat	gga	acg	aag	aac	gtt	gcc	gcc	ggt	ttc	ttc	cag	atc	cgg	ttt	act	gtg	caa
K	G	N	G	T	K	N	V	A	A	G	F	F	Q	I	R	F	T	V	Q
tta	cac	aac	ccg	aaa	tag														
L	H	N	P	K	-														

Şekil 4. 14. PeVYVAnt01 izolatının kılıf proteinine ait açık okuma bölgeleri (ORF3)

ORF 3 bölgesi 618 nt, 206 amino asitten meydana gelmektedir. Metiyonin amino asidi ile başlayıp stop kodonu ile biten kılıf proteinini oluşturmaktadır. PeVYV'nin kılıf proteini koruyucu tabaka olarak canlılığının devamını sağlamaktadır (Şekil 4. 14).

5'3' Frame 1

atg	gaa	atg	gtg	gat	cac	gca	gca	ccc	gcc	gtc	gta	gac	gcc	cac	gac	agg	ttc	gcc	ctg
M	E	M	V	D	H	A	A	P	A	V	V	D	A	H	D	R	F	A	L
tgc	tgg	tgg	tgc	cac	ccc	ctg	ggc	gca	cac	ggc	gag	gaa	atc	gaa	gac	gac	gaa	atg	gag
S	L	W	S	H	P	L	G	A	H	G	E	E	I	E	D	D	E	M	E
gca	gga	acc	gaa	gaa	gcc	gaa	ata	gag	tgg	gag	gaa	ggt	cga	gca	aca	gcg	aaa	ctt	tca
A	G	T	E	E	A	E	I	E	L	E	E	G	R	A	T	A	K	L	S
tct	tca	aca	agg	act	caa	tca	agg	ata	gtt	cct	cag	gat	ctg	tca	cct	tgc	ggc	cgt	ctc
S	S	T	R	T	Q	S	R	I	V	P	Q	D	L	S	P	S	G	R	L
tat	cag	aga	gca	tgc	cgc	ttt	cag	gtg	gag	ttc	tca	aag	cct	acc	atg	aat	ata	aga	tca
Y	Q	R	A	S	R	F	Q	V	E	F	S	K	P	T	M	N	I	R	S
caa	tgg	tca	aca	tac	gct	tgc	tca	gtg	aat	cct	ctt	cca	cag	cgg	agg	gct	cca	tgc	ctt
Q	W	S	T	Y	A	S	S	V	N	P	L	P	Q	R	R	A	P	S	L
acg	agc	tgg	acc	ccc	act	gca	agc	tta	cta	gtc	tcc	aat	cca	ccc	tgc	gta	aat	tcc	cgg
T	S	W	T	P	T	A	S	L	L	V	S	N	P	P	C	V	N	S	P
tca	cca	aag	gcg	ggc	aag	cga	ctt	ttc	ggg	ctt	cgc	aga	tta	acg	ggg	tag			
S	P	K	A	G	K	R	L	F	G	L	R	R	L	T	G	-			

Şekil 4. 15. PeVYVAnt01 izolatının movement proteinine ait açık okuma bölgeleri (ORF4)

ORF4, 471 nt, 157 amino asitten meydana gelmektedir. Metiyonin amino asidi ile başlayıp stop kodonu ile biten movement proteini oluşturmaktadır. PeVYV'nin hareketi için gerekli olan hareket proteinini oluşturmaktadır.

5'3' Frame 1

atg	tac	aag	tgg	gaa	gat	gag	aag	tgg	gac	aaa	gtc	aac	ctc	caa	gct	ggt	tat	tct	cga
M	Y	K	W	E	D	E	K	W	D	K	V	N	L	Q	A	G	Y	S	R
aat	gac	cgg	cgg	tgt	atg	gaa	aca	tac	ctc	acc	atc	cca	gca	gac	aaa	gga	aaa	ttt	cat
N	D	R	R	C	M	E	T	Y	L	T	I	P	A	D	K	G	K	F	H
gtc	tat	ctt	gaa	gct	gat	ggt	gaa	ttt	gtc	ggt	aag	cat	att	ggc	ggc	gat	ttg	gac	ggt
V	Y	L	E	A	D	G	E	F	V	V	K	H	I	G	G	D	L	D	G
agt	tgg	ctt	ggc	aac	att	gcc	tat	gat	gtc	tct	caa	cga	ggt	tgg	aca	ata	ggg	aac	tac
S	W	L	G	N	I	A	Y	D	V	S	Q	R	G	W	T	I	G	N	Y
aaa	ggt	tgt	aaa	ata	aag	aac	ttt	caa	acg	aat	aca	acc	ttt	gtg	gcg	ggg	cac	cgg	gat
K	G	C	K	I	K	N	F	Q	T	N	T	T	F	V	A	G	H	P	D
gct	aag	atg	aat	ggc	aaa	act	ttt	gac	agc	gcc	cgg	gca	gta	gag	gta	gat	ttg	ttc	gct
A	K	M	N	G	K	T	F	D	S	A	R	A	V	E	V	D	W	F	A
tcc	ttc	gaa	cta	gaa	tgt	gat	gat	gaa	gag	gga	agt	tgg	atg	att	tat	ccc	cct	cca	atc
S	F	E	L	E	C	D	D	E	E	G	S	W	M	I	Y	P	P	P	I
caa	aaa	gat	gcc	tct	tat	aat	tac	acc	gtt	tca	tat	ggt	aat	tat	acg	gag	aag	tat	tgt
Q	K	D	A	S	Y	N	Y	T	V	S	Y	G	N	Y	T	E	K	Y	C
gaa	tgg	gga	gcc	ata	tct	gtt	tca	att	gat	gaa	gat	aat	gag	ggg	tac	gca	cca	aga	aga
E	W	G	A	I	S	V	S	I	D	E	D	N	E	G	Y	A	P	R	R
ata	cca	cgc	aag	ggg	gaa	atg	gcg	tgg	tca	gat	cgg	gag	aag	gat	tac	tcc	gaa	gac	aaa
I	P	R	K	G	E	M	A	W	S	D	P	E	K	D	Y	S	E	D	K
ccc	cag	aag	gaa	aac	tgg	aac	act	gaa	ccc	ctg	gac	aca	ggt	aaa	ata	gat	cga	gaa	aga
P	Q	K	E	N	W	N	T	E	P	L	D	T	G	K	I	D	R	E	R
caa	ctc	gtt	aaa	act	cca	tct	ccg	gat	gtc	tct	gat	tct	ggt	tca	gag	ctc	ggg	gca	gat
Q	L	V	K	T	P	S	P	D	V	S	D	S	G	S	E	L	G	A	D
ccc	ata	cct	cag	gat	ctg	atc	gat	aag	gtt	aac	aag	gga	gaa	gca	ctg	gac	cct	atg	caa
P	I	P	Q	D	L	I	D	K	V	N	K	G	E	A	L	D	P	M	Q
caa	ctt	gaa	tat	gat	aag	tat	agg	ttt	cag	gaa	aat	atc	atc	gaa	ctc	agt	gaa	tca	caa
Q	L	E	Y	D	K	Y	R	F	Q	E	N	I	I	E	L	S	E	S	Q
gat	caa	act	tct	gag	tac	ccc	aag	ctt	ccc	ccc	ccc	gtc	cca	cac	aag	cgg	ctt	ccc	tca
D	Q	T	S	E	Y	P	K	L	P	P	P	V	P	H	K	P	L	P	S
ggt	aga	act	gaa	aag	tat	ttt	aaa	cct	agt	gct	gac	ctt	ttg	gag	gcc	tgg	gat	aaa	gat
G	R	T	E	K	Y	F	K	P	S	A	D	L	L	E	A	W	D	K	D
cac	ttc	aac	cct	ggt	tat	act	aag	gaa	gaa	gtg	gcc	gcg	gct	aca	ata	atc	tct	cac	ggt
H	F	N	P	G	Y	T	K	E	E	V	A	A	A	T	I	I	S	H	G
tct	ata	gcc	gat	ggg	aga	gac	gct	ttg	gaa	gaa	aga	gat	aac	aag	atc	caa	cga	gcc	cga
S	I	A	D	G	R	D	A	L	E	E	R	D	N	K	I	Q	R	A	R
gtt	tgg	tgg	tct	cat	gat	aag	tca	acg	aca	agt	cct	tcc	ata	gct	aaa	tta	aga	gaa	aag
V	S	W	S	H	D	K	S	T	T	S	P	S	I	A	K	L	R	E	K
acc	ctt	gaa	aag	aaa	gct	tta	tct	agt	ggg	tct	ttg	aga	cgg	ggt	tct	gaa	gcc	gct	tcc
T	L	E	K	K	A	L	S	S	G	S	L	R	R	G	S	E	A	A	S
tct	tta	gga	ggt	ggt	tct	ata	act	ggt	ggt	acc	tta	aag	cca	aag	aag	aca	att	gag	gag
S	L	G	G	G	S	I	T	G	G	T	L	K	P	K	K	T	I	E	E
gaa	ata	gtt	tcc	aaa	ctt	act	aca	act	caa	agg	ctt	agg	tat	gag	caa	ctc	aaa	gct	cgg
E	I	V	S	K	L	T	T	T	Q	R	L	R	Y	E	Q	L	K	A	R
aat	cag	acg	gct	gcg	aac	aac	tat	ttg	tgg	tca	gtc	gag	gtt	cct	cct	gaa	aaa	cca	cct
N	Q	T	A	A	N	N	Y	L	W	S	V	E	V	P	P	E	K	P	P
ggt	cct	tct	caa	ttt	aaa	gga	cgg	tct	cag	ctc	tag								
G	P	S	Q	F	K	G	R	S	Q	L	-								

Şekil 4. 16. PeVYVAnt01 izolatının P5 proteinine ait açık okuma bölgeleri (ORF5)

ORF5, 1599 nt, 533 amino asitten meydana gelmektedir. Metiyonin amino asidi ile başlayıp stop kodonu ile biten P5 proteinini oluşturmaktadır. P5 proteini PeVYV'nin yaprak biti ile iletimini etkilemektedir (Şekil4.16).

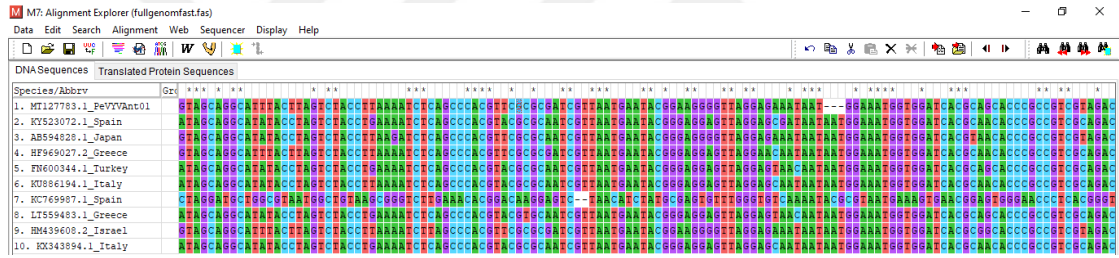
4.3.2.2. PeVYV'nin filogenetik analizleri

Filogenetik ilişkiler incelenmek için NCBI veri tabanını kullanılarak izolatlar taranmış ve farklı ülkelerden rapor edilen 9 PeVYV izolatlarıyla kıyaslama yapılmıştır. Greece:Lasithi- Pi24 izolat (Accession no. HF969027.2) ile %95 oranında ve Italy- IT108 izolat (Accession no. KU886194.1) ile %94 oranında benzer bulunmuştur.

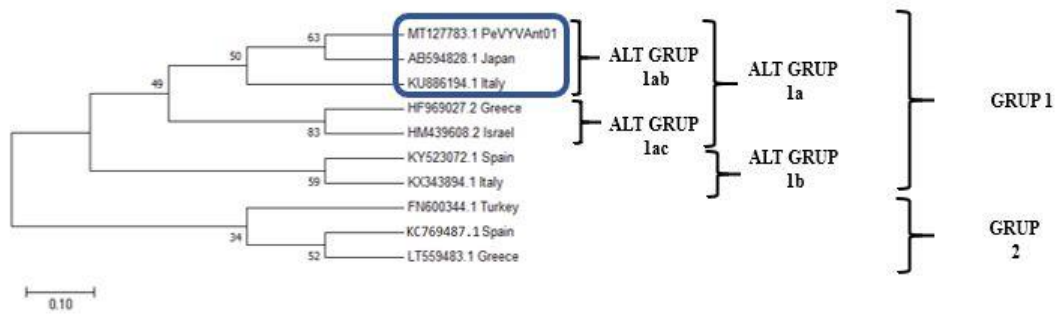
Yapılan filogenetik analizlerde MEGA 7 programı kullanılarak PeVYVAnt01 izolat ile Çizelge 4.1'deki izolatların kıyaslaması yapılmıştır. Filogenetik ağaç çiziminde Neighbor-Joining yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur.

Çizelge 4. 1. PeVYV'nin filogenetik analizde kullanılan izolatlar

No.	Genbank	Ülke	Konukçu Bitki	Benzerlik (%)
1	HF969027.2	Yunanistan	<i>Capsicum annuum</i>	95
2	KU886194.1	İtalya	<i>Capsicum annuum</i>	94
3	KX343894.1	İtalya	<i>Capsicum annuum</i>	94
4	FN600344.1	Türkiye	<i>Capsicum annuum</i>	94
5	KC769487.1	İspanya	<i>Capsicum annuum</i> var. <i>Melchor</i>	93
6	AB594828.1	Japonya	<i>Capsicum baccatum</i>	93
7	LT555582.1	Yunanistan	<i>Capsicum annuum</i>	93
8	KY523072.1	İspanya	<i>Capsicum annuum</i>	92
9	HM439608.2	İsrail	<i>Capsicum annuum</i>	92



Şekil 4. 17. PeVYVAnt01 izolatının dünya izolatlarıyla kıyaslaması

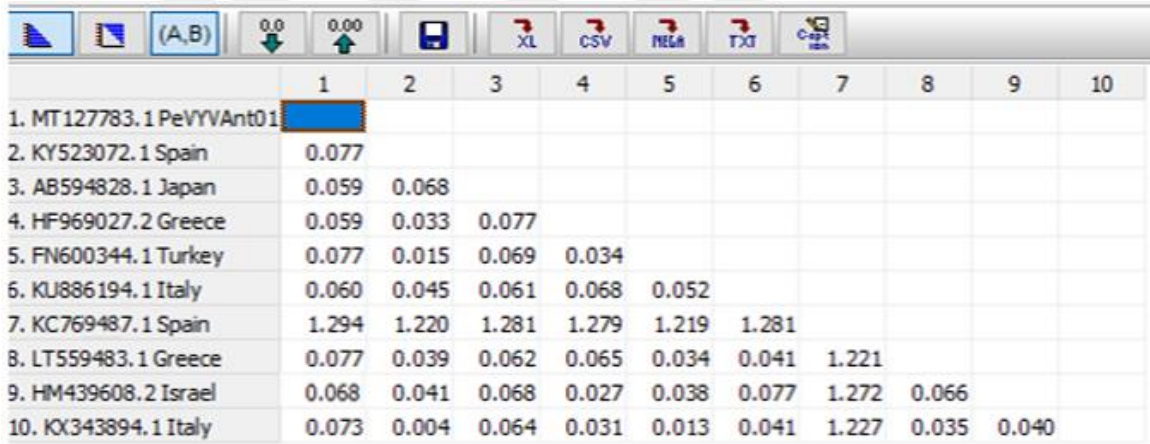


Şekil 4. 18. PeVYVAnt01 izolatı ile dünya izolatları arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren ağaç

Neighbor-joining yöntemine göre hazırlanan filogenetik ağaç analizini oluştururken Türkiye, İspanya, İtalya, Yunanistan, Japonya ve İsrail izolatlar seçilmiştir. Çoğunlukla biber bitkisinde tespit edilen kayıtlara ulaşıldığı için biber bitkisi üzerinde saptanan PeVYV izolatlarından oluşturulmuştur. PeVYVAnt01 izolatı temel alınarak

filogenetik ağaca bakıldığında iki ana gruba ayrılmıştır ve Grup 1 ve Grup 2 olarak isimlendirilmiştir. Grup 1 kendi arasında iki ana gruba ayrılmıştır ve Alt Grup 1a, Alt Grup 1b olarak adlandırılmıştır. Alt grup 1a kendi içerisinde tekrar 2 gruba ayrılmıştır Alt grup 1ab ve Alt grup 1ac olarak adlandırılmıştır. PeVYVAnt01 izolatı Alt Grup 1ab de yer almaktadır. PeVYVAnt01 izolatımız %95 oranında benzer bulunduğu HF969027.2 GenBank numaralı Yunanistan'dan kaydedilen biber izolatıyla aynı grupta yer almıştır. Bu da her iki ülkedeki enfeksiyon ortak atadan geldiğini göstermektedir. Genetik uzaklıklara bakıldığında bu izolatlar arasında ırk ve patotip düzeyinde bir farklılığın olmadığı istatistiksel olarak (0,059) ortaya konulmuştur.

Daha önce Türkiye'den rapor edilen PY izolatı (Accession no. FN600344.1) 1630 bp'lik sekansa sahiptir ve tüm genomu verilmemiştir. Antalya'dan elde ettiğimiz (Accession no. MT127783.1) PeVYVAnt01 izolatları arasında farklılığın olduğu görülmüştür. Filogenetik ağaçta da iki farklı grupta yer almaları Türkiye'deki PeVYV için iki haplotipi olduğunu göstermektedir. Bu da virüsün bölgelere göre rekombinasyonunu göstermektedir. Türkiyeden elde edilen diğer izolatın tüm genomu elimizde olsaydı farklı ırk olup olmadığı konusunda daha fazla bilgi elde edilebilirdi. Antalya'dan elde ettiğimiz izolatların arasında bir farklılık olmadığı ve bunların tek bir izolat olduğu blastlamalar sonucunda ortaya çıkmış ve tek bir izolatın kaydı NCBI'a yapılmıştır.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. MT127783.1 PeVYVAnt01										
2. KY523072.1 Spain	0.077									
3. AB594828.1 Japan	0.059	0.068								
4. HF969027.2 Greece	0.059	0.033	0.077							
5. FN600344.1 Turkey	0.077	0.015	0.069	0.034						
6. KU886194.1 Italy	0.060	0.045	0.061	0.068	0.052					
7. KC769487.1 Spain	1.294	1.220	1.281	1.279	1.219	1.281				
8. LT559483.1 Greece	0.077	0.039	0.062	0.065	0.034	0.041	1.221			
9. HM439608.2 Israel	0.068	0.041	0.068	0.027	0.038	0.077	1.272	0.066		
10. KC343894.1 Italy	0.073	0.004	0.064	0.031	0.013	0.041	1.227	0.035	0.040	

Şekil 4. 19. Filogenetik ağaçta kıyaslanan PeVYVAnt01 izolatının genetik uzaklık tablosu

Genetik uzaklık yöntemi, birbirlerine genetik uzaklığı olan her bir çift arasında değişikliklerin sayısını baz almaktadır. Genetik uzaklığı en az olan türler birbirine en çok benzeyen türler ve genetik uzaklığı en fazla olan türler en az benzeyen türler olarak varsayılmaktadır. Bu genetik uzaklıklar birleştirilerek filogenetik ağaç oluşturulmaktadır. Genetik uzaklık tablosuna bakıldığında PeVYVAnt01 izolatına en yakın izolat 0.59 genetik farklılık değeri ile HF969027.2 ve AB594828.1 GenBank numaralı Yunanistan ve Japonya izolatları görülmektedir. PeVYVAnt01 izolatına en uzak izolat 1.294 genetik farklılık değeri ile KC769487.1 GenBank numaralı İspanya izolatı görülmektedir.

5. TARTIŞMA

Ilıman iklimlerde yetişen biber, patlıcangiller (*Solanaceae*) familyasının bir kültür bitkisi. *Capsicum* cinsine bağlı olup en yaygın yetiştiriciliği yapılan türü *Capsicum annuum* L. olarak bilinmektedir. Dünyanın farklı bölgelerinde yetiştiriciliği yapılmaktadır ve yeni dünya bitkisi olarak adlandırılmaktadır. Sağlık açısından saymakla bitmeyen faydaları olan biber, kapsaisin maddesi içermektedir. Kapsaisin sayesinde gastrik kanseri, pankreas kanseri ve akciğer kanserleri gibi hastalıkların tedavilerinde geleneksel tedavi olarak rapor edilmektedir (Oğuzkan vd. 2018).

Biber diğer bitkiler gibi abiyotik ve biyotik faktörlerden etkilenmektedir. Abiyotik faktörler; su, ışık, radyasyon, sıcaklık, nem, atmosfer, asitlik, toprak vs. yer almaktadır. Bu gibi abiyotik faktörlerden biber bitkileri korunabilmektedir. En önemli olan biyotik faktörlerdir ve bunlar virüs, bakteri, fungus ve nematod olarak yer almaktadır. İçlerinden sadece virüsün bitki koruma kimyasalı bulunmamaktadır ve en önemli tehdidi virüs hastalıkları oluşturmaktadır. Dünya biber üretimine bakıldığında ülkemiz ilk üç sırada yer almasından dolayı biber sirkülasyonu nedeniyle biber virüs hastalıkları ülkemizde oldukça yaygındır. Virüs hastalıklarının kimyasal mücadelesi bulunmamasından dolayı bitki korumacılar ve ıslahçılar kültürel mücadeleler ve dayanıklılık çalışmalarına yön vermişlerdir. Bu çalışmalar sayesinde majör biber virüslerine karşı önlemler alınmaya çalışılmıştır. Majör virüslerin yaygınlığının azalması ile ortamda var olan minör virüsler belirginleşmiştir. Biber virüsleri içerisinde minör virüs olan PeVYV'e yönelik yürütmüş olduğumuz bu çalışma kapsamında *Pepper vein yellows virus*'ün tüm genom organizasyonu ve bu organizasyondaki görevleri belirlenmeye çalışılmıştır.

Arazi çalışmalarında PeVYV'ye ait semptom özellikleri; bitkide bodurluk, boğum aralarında kısılma, yaprakta damarlar arası sararma, yaprak damarlarının yukarı doğru kıvrılması, yaprak boyutlarının küçülmesi, meyvelerde boyut küçülmesi, meyvede şekil bozukluğu ve meyvede renk değişikliği göz önüne alınarak çalışma yürütülmüştür. PeVYV özellikle besin element eksikliği ile karıştırılmaktadır. Özellikle çinko, bakır, magnezyum gibi besin elementlerinin eksikliklerindeki yaprak semptomları PeVYV'e çok benzemektedir. Arazi içerisinde genel bitkiler incelenirken bitkilerin hepsinde semptom gözleniyor ise muhtemelen besin element eksikliği olarak baz alınmalıdır. Ancak biyotik etmenler (bakteri, virüs, fungus, nematod) arazi içerisinde her bitkide görülmemektedirler.

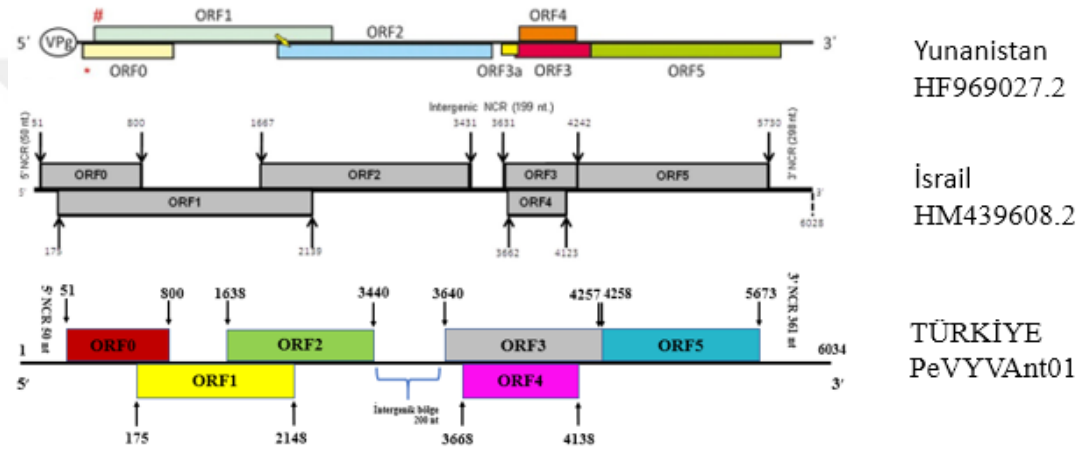
PeVYV'nin yaprak bitleri ile taşındığı ile ilgili bilgiler ve denemeler birçok araştırmada yer almıştır (Lecoq vd. 1992; Murakami vd. 2011; Dombrovsky vd. 2013; Lotos 2017; Fox ve Lloyd 2018). PeVYV'nin taşınımında görev yapan yaprak bitleri *Aphis gossypii* ve *Myzus persicae* sera içerisinde yavaş hareket ettikleri için genellikle sera kenarlarındaki bitkilerde yaşamlarını devam ettirmektedir. Sera içerisine bakıldığında yaprak bitlerinin popülasyonları baz alınarak sera girişindeki bitkilerden seranın merkezine doğru PeVYV'nin yoğunluğu azalmaktadır. Örneklerin elde edilmesinde sera içerisindeki yaprak biti varlığı önemsenmiştir ve seranın içerisindeki ilk sıra bitkilerde semptomlar gözlemlenmiştir. PeVYV'nin yayılmasının tek sebebi yaprak bitleridir ve yaprak bitlerine kimyasal mücadele yapılarak PeVYV'nin yayılması engellenebilmektedir.

Tez çalışmasında; moleküler çalışmalar ile virüs partiküllerinin elektron mikroskobu çalışmaları paralel yürütülmüştür. Virüsler birçok sınıflandırmaya tabi tutulmaktadır ve en kolay sınıflandırma virüsün morfolojik sınıflandırmasıdır. 1898 yılında Tütün mozaik virüsü'nün keşfedilmesinden bu yana Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesinin açıkladığı verilerde 6000'den fazla virüsün detaylı incelendiği, milyonlarca virüsün ise daha dünya ile tanışmadığı bilinmektedir. Virüslerin tanımlanmasında yer alan elektron mikroskop görüntüsü ilk olarak Tütün Mozaik virüsünün görüntüsü alınmasıyla keşfedilmiş ve günümüzde de hala kullanılmaktadır. Tütün mozaik virüsün ilk görüntüsü alındığında çubuk şeklinde olduğu belirlenmiştir. Gün geçtikçe aynı ailede yer alan virüslerin aynı morfolojik yapıya sahip olduğu belirlenmiştir (ICTV 2011). 2020 yılında tüm dünyayı etkisi altına alan *Coronavirus* (Covid-19) Çin'in Wuhan kentinde yayılmaya başlamış ve hala pandemi oluşturmaya devam etmektedir. *Coronavirus* belirtilerini göstermeye başladığında araştırmacılar ilk olarak etmenin elektron mikroskop görüntüsünü alarak virüsü tanımlamaya çalışmıştır (Gürsu 2020). Virüsün varlığını ortaya koymak için morfolojik yapısını incelemek yapılan çalışmanın özgünlüğünü arttırmaktadır. Yürütmüş olduğumuz bu çalışmada elde edilen örneklerin morfolojik yapısı elektron mikroskopunda incelenmiştir. PeVYV yaklaşık 25 nm büyüklüğünde ve ikosahedral simetriye sahip olduğu belirlenmiştir. Yonaha ve arkadaşları (1995) PeVYV'nin ilk elektron mikroskop görüntüsünü elde etmişlerdir. PeVYV ile ilgili diğer çalışmalarda elektron mikroskop görüntüsü alınmamıştır. Eğer elektron mikroskop çalışması yapılacaksa taze yapraklardan alınmalı ve -20°C ya da -80°C de saklanmadan incelemenin başarılı olduğu bulunmuştur. Benzer sonuçlar Fidan ve arkadaşlarının (2020) ToBRFV için yapılan çalışmada da vurgulandığı gibi canlı bitkinin yeni sürgünlerinden yapılan elektron mikroskop çalışmalarının daha başarılı olduğu görülmüştür.

Moleküler çalışmalar sırasında örnekler PeVYV'nin tür ve genom primerleri ile taranmış ve pozitif olduğu belirlenen örnekler ile tüm genom dizilemesi elde edilmiştir. Tür ve genom primerleri olarak çeşitli araştırmacıların primerleri denenmiştir. Tür primerlerinde en etkili çalışan primerler PY-F3802-PY-dR-4186-4205 ve PY-F-3826-3846-PY-dR-4186-4205 olmuştur. Bu primerlerin etkili çalışmasının nedeni virüsün ORF 3 bölgesinin kılıf proteininden oluşturulmasıdır. Virüsün genomunu çevreleyen protein yapısındaki kılıfa kapsid, kapsidi oluşturan her bir yapıya kapsomer olarak adlandırılır. Kapsomerler farklı virüslerde farklı dizilimler oluşturmaktadır yani her virüsün kılıf proteini kendine özgü olduğu için bu primerler tercih edilmiştir. Genom primeri PYDGroupUp-PYDGroupDown en etkili çalışmıştır. Grup primeri ORF2 bölgesinde yer alıp RNA'ya bağlı RNA polimeraz bölgesinden oluşturulmuştur. Bu bölge transkripsiyonun gerçekleştiği bölgedir ve virüsler familya olarak aynı şekilde çoğaldığı için bu primerler tercih edilmiştir.

Lotos ve arkadaşlarının önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi Yunanistan'da PeVYV tespit edilmiştir ve 2009 yılında ülkemizde yapmış oldukları bir çalışmada *Pepper yellows virüs* olarak adlandırmış oldukları bir virüsün kısa bir genomunu NCBI'a kaydını yapmışlardır (Accession no FN600344.1). Hem ülkemizde yapılan çalışmadan dolayı hem de Yunanistan'ın ülkemize komşu olmasından dolayı onların izolatları ile bizim izolatımızın benzerliği göz önüne alınmıştır. Bu sebeple tüm genom analizi çalışmalarında Lotos ve arkadaşlarının (2017) tasarladıkları genom primerleri kullanılmıştır.

Moleküler çalışmalar sonucunda tüm genom elde edilmiş olup anlamlı bölgeler (ORF) taranmış ve protein dizilimleri belirlenmiştir. Yunanistan 2013 yılında çalışmalara başlamıştır ve virüsün ilk tespitinde *Pepper yellows virus* olarak adlandırmışlardır. 2017 yılında tüm genom elde edilmiş ve NCBI’da blast yapıldığında *Pepper vein yellows virüs* ile benzerlik gösterdiği için *Pepper vein yellows virüs* olarak kaydedilmiştir (Lotos vd 2017). İsrail 2010 yılında çalışmalara başlamıştır tespit ettikleri virüsü *Pepper yellow leaf curl virus* olarak adlandırmışlardır. ORF4 ve ORF 3 bölgelerini çoğalttıklarında ülkemizden alınan izolat (Accession no FN600344.1) ile benzerlik bulmuşlardır. 2013 yılında yapılan diğer çalışmada ise tüm genom elde edilmiş ve PeVYV ile benzerlik yaklaşık %91 oranında çıkmıştır. Şekil 5.1’e bakıldığında PeVYVAnt01 izolatının genom organizasyonu, Yunanistan’ın ve İsrail’in genom organizasyonuna benzemektedir. Küçük nükleotit farklılıkları dışında ORF bölgelerinin genom üzerinde aynı lokasyonda olması genom benzerliğini ortaya koymaktadır.



Şekil 5. 1. Dünya izolatları ile PeVYVAnt01 izolatının genom organizasyonu karşılaştırması

Luteoviridae familyası genellikle 5,600 ila 6,000 nükleotidlik (nt) RNA genomuna ve beş veya altı açık okuma çerçevesine sahiptir. *polerovirüs* cinsinin üyeleri genomun 5 'ucunda ORF1 ile kısmen örtüşen fazladan bir ORF0'a sahiptir ve P0 proteinini oluşturmaktadır. P0 proteini bitki savunma tepkisini baskılayan RNA susturucu olarak adlandırılan göreve sahiptir. ORF1 ve ORF2 P1 ve P2 proteinlerini kodlar. RNA'ya bağımlı RNA polimeraz proteinini (RdRp) oluşturmaktadır. ORF3, kaplama proteinini (CP) kodlar. ORF4 bitkide virüs hareketi için gerekli olan hareket proteinini oluşturmaktadır. ORF5, yaprak biti iletimi için gerekli olan P5 proteinini oluşturmaktadır (Pagán ve Holmes 2010; Dombrovsky vd., 2013). Bizim izolatımızda *Polerovirus* genomunun tipik özelliklerini gösteren 6 ORF bölgeleri tespit edilmiştir.

Son yıllarda yaygınlığı artan *Pepper vein yellows virus* (PeVYV), 1981'de ilk kez Japonya'nın Okinawa kentindeki seralarda gözlenmiştir. Benzer bir hastalık 1998'de İsrail'de gözlenmiştir. Avustralya, Çin, Japonya, İtalya, Yunanistan ve İspanya'dan izole edilen türlerin PeVYV ile ilgili olduğu tespit edilmiştir. PeVYV'ler 5 kıtada 20 ülkede kaydedilmiştir. Bunun gibi dağınık bir dağılımın sebebi muhtemelen başka raporların olmamasına dayanmaktadır. (NPPO 2016). Son zamanlarda PeVYV ülkemizde de

yaygınlığı artan virüsler arasında bulunmaktadır (Buzkan vd. 2013). Yürütülen çalışmada, filogenetik ağaca bakıldığında PeVYVAnt01 izolatının genom organizasyonu İtalya (Accession no KU886194.1) ve Japonya (Accession no AB594828.1) ile aynı dalda yer almıştır. NCBI veri tabanında benzerliğine bakıldığında İtalya ile %94 Japonya ile %93 oranında benzemektedir. 2016 yılında İtalya’da yapılan çalışmada KU886194.1 GenBank nolu izolat Japonya (Accession no AB594828.1) ile aynı alt grupta yer almaktadır. PeVYVAnt01 izolatının İtalya ile benzemesinin nedeni; iki izolatın da Akdeniz bölgesinde olması sebebiyle ülkeler arasında tarım ticaretinin yapılması sırasında bitki materyali üzerinde yaprak bitlerinin taşınması ihtimalini oluşturmuştur. AB594828.1 GenBank nolu izolat 2011 yılında Japonya’nın Okinawa kentinde tespit edilmiştir ve benzerliğin yüksek olması iki izolatın aynı atadan geldiği ihtimali varsayılmaktadır. PeVYVAnt01 izolatının alt gruplarına bakıldığında Yunanistan ile benzerlik oranının yüksek çıkması ülkemize komşu olması ve vektörler ile gelmiş olabileceği ihtimal verilmektedir. FN600344.1 GenBank nolu izolat Antalya’dan alınan bir izolattır ve PeVYVAnt01 izolat ile %94 oranında benzemektedir. PeVYVAnt01 izolat ile FN600344.1 GenBank nolu izolat ağaçta aynı dalda yer almamasının nedeni sadece 1630 nükleotitik küçük bir alanın çalışılmış olmasıdır. Tüm genom çalışılmış olsaydı %100 benzerlik göstereceği düşünülmektedir. Filogenetik ağaca genel bakıldığında Avrupa ülkelerinin ve özellikle Akdeniz ülkelerinin çoğunluğu oluşturduğu görülmektedir. Ülkemize yakın olmaları ve tarımsal alışverişin yoğun yapılması nedeni ile PeVYV’nin ülkemize gelmesi muhtemeldir. Yunanistan’da da yapılan çalışmalarda ve diğer ülkelerin benzer çalışmalarında hastalıkların ticaret yoluyla, vektörler vasıtasıyla, komşu ülkelerin birbirleriyle bitki alışverişi yoluyla yayıldığı onlar tarafından da rapor edilmiştir (Murakami vd. 2011; Dombrovsky vd. 2013; Villanueva vd. 2013; Tomassoli vd. 2016; Lotos vd. 2017; Bozan vd. 2018; Fidan 2020)

Ülkemizde biber üretim alanlarında bulunan majör virüsler minör virüsleri baskılamaktadır. Fark edilmesi zorlaşan minör virüsler, çiftçiler ve bitki korumacılar tarafından element noksanlığı olarak karıştırılmaktadır. İslahçılar majör virüsler üzerinde dayanıklılık çalışmaları yürüttükleri için minör virüsler belirginleşmeye başlamıştır. Yürütülen çalışma sonucunda ülkemiz biber yetiştiriciliği için sevindirici olmuştur. PeVYV’nin dünyada tüm genomu tespit edilmesi ve ülkemizde sadece varlığı rapor edilmesi sebebiyle ülkemiz açısından büyük eksikliktir. Bu çalışma sayesinde eksiklik giderilmiş ve PeVYV’nin tüm genom organizasyonu belirlenmiş ve moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. NCBI gen bankasına Türkiye PeVYV tüm genom kaydı yapılmıştır.

Günümüzde teknolojinin ve sistemlerin ilerlemesi virüslerin yapılarını, göç haritalarını, tüm genomlarını tespit etmemizi olanak sağlamaktadır. Çiftçilerin majör ve minör virüsleri fark etmesinin sağlanması ile bu çalışma çiftçilere, ıslahçılara, tarım bakanlığında çalışanlara referans olacaktır. Bundan sonraki çalışmalarda bu virüse karşı bir dayanıklı bir hassas popülasyonun oluşturularak dayanıklılık mekanizmasının çalışması gerekmektedir. Üniversite ve ıslahçı işbirliği yapılarak virülensliği bilinen tüm genomların izolatları kullanılarak dayanıklılık çalışmaları yürütülmelidir. İlerde yapılması gereken çalışmalar için hastalık bankasına laboratuvar bünyesinde saklanan izolatlar dahil edilmelidir.

6. SONUÇLAR

Antalya ilinde biber üretimi yapılan ekim alanlarında 2019-2020 yılları arasında Biber damar sarılık virüs'ünün (PeVYV) saptanması, elde edilen tüm genomun moleküler karakterizasyonu yapılan bu çalışmada genel olarak aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

Türkiye'de varlığı rapor edilen çalışma temel alındığında yine Antalya bölgesinde de bu hastalığın varlığı tespit edilmiştir. Biber üretim alanlarında PeVYV ile bulaşık bitkilerde yapraklarda damarlar arasında sararma ve damarların yukarı doğru kıvrılması, yaprak boyutlarının küçülmesi gibi belirtiler tespit edilmiştir. Biber ağaçlarında bodurlaşma ve meyvelerde renk değişikliği ve boyut küçülmesi tespit edilmiştir.

Biber üretim alanlarda virüs vektörü olan yaprak bitlerinin biber bitkisinden beslenmesi sonucu ortaya çıkardığı belirtiler PeVYV'den kaynaklandığı tespit edilmiştir. Sera geneline bakıldığında yaprak bitleri sera kenar sıralarda yoğunluk gösterdiğinden dolayı PeVYV daha çok sera kenar sıralarında yoğunluk gösterdiği tespit edilmiştir. Ortamın nemi ve sıcaklık artışıyla hızlı ve çok üremeleri mücadeleyi yetersiz kılmaktadır. Bu nedenden dolayı hastalıkla mücadelede dayanıklılık çalışmaları yürütülmelidir.

Simptomatolojik belirtiler gösteren bitkilerdeki virüsün varlığını saptamak için elektron mikroskopundan görüntü alınmıştır. 100 gr canlı bitkilerin yeni sürgünlerinden alınan simptomatik biber bitkilerinden alınan virionlar karbon kaplı bakır 300 mesh'lik grid ile taranarak 25 nm lik bazı küresel parçacıklar fotoğraflanmıştır.

Biber arazilerinden toplanan örnekler, PeVYV'nin varlığını belirleyebilmek için RT-PCR teknikleri ile testlenmiştir. PeVYV hastalığı ile bulaşık olan izolatlar tüm genom bilgileri elde edilmiştir. RT-PCR metodu, sekans analizi metodu ve filogenetik ağaçlar kullanılarak moleküler karakterizasyon çalışmaları tamamlanmıştır.

Tüm genom bilgileri elde edildikten sonra NCBI gen bankasına MT127783.1 erişim numarası ile kaydı yapılarak bilim dünyasına sunulmuştur. PeVYVAnt01 olarak isimlendirilen izolatının NCBI'a kayıtlı izolatlar ile karşılaştırmaları yapılmıştır ve en yüksek benzerliği gösteren HF969027.2 (Yunanistan) GenBank numaralı izolat belirlenmiştir.

Arazide tespiti için simptomatolojik özellikleri, virüsün varlığını belirlemek için tür ve grup primerlerinin optimizasyonu, virüsün yapısı ve ırklarını belirlemede tüm genom haritalama primerleri, fiziksel özelliklerini belirlemede elektron mikroskobu yönteminin bütün prosedürleri bulunarak bundan sonraki çalışmalarda sunulmak amacıyla bilim dünyasının hizmetine sunulmuştur.

7. KAYNAKLAR

- Afouda, L., Kone, D., Zinsou, V., Dossou, L., Kenyon, L., Winter, S., & Knierim, D. 2017. Virus surveys of Capsicum spp. in the Republic of Benin reveal the prevalence of pepper vein yellows virus and the identification of a previously uncharacterised polerovirus species. *Archives of virology*, 162(6), 1599-1607.
- Andrews, J. 1999. The pepper trail: history and recipes from around the world (No. BOOK). The University of North Texas Press.
- Anonim 2020. https://viralzone.expasy.org/610?outline=all_by_species [Son erişim tarihi: 02.11.2020].
- Anonymus 2020 <https://harvesttotable.com/?s=pepper> [Son erişim tarihi: 02.11.2020].
- ARIN, L. 2018. Kapsaisin ve Tarımda Kullanımı. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(4), 21-27.
- Bozan, O., Gil, J. Y. M., Önelge, N. 2018. Turunçgil Tristeza Virüs Hastalığı; Türkiye Turunçgil Tarımı İçin Potansiyel Bir Tehlike. *Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 33(2), 177-188.
- Bozokalfa, M. K., Eşiyok, D. 2010. Biber (Capsicum annum L.) aksesyonlarında genetik çeşitliliğin agronomik özellikler ile belirlenmesi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 47(2), 123-134.
- Buzkan, N., Arpacı, B. B., Simon, V., Fakhfakh, H., Moury, B. 2013. High prevalence of poleroviruses in field-grown pepper in Turkey and Tunisia. *Archives of virology*, 158(4), 881-885.
- Çelik İ, Özalp R, Çelik N, Polat İ, Sülü G, Ünlü A. 2013. Patates Y virüsü (Potato Virus Y = PVY)'ne dayanıklı sivri biber hatlarının geliştirilmesi. *Derim* 30(2):42-53.
- Dombrovsky, A., Glanz, E., Lachman, O., Sela, N., Doron-Faigenboim, A., 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.
- Dombrovsky, A., Glanz, E., Pearlsman, M., Lachman, O., Antignus, Y. 2010. Characterization of Pepper yellow leaf curl virus, a tentative new Polerovirus species causing a yellowing disease of pepper. *Phytoparasitica*, 38(5), 477-486.
- Duman, A. D., Zorlugenç, B., Evliya, B. 2002. Kahramanmaraş'ta kırmızı biberin önemi ve sorunları. *KSÜ Fen ve Müh Derg*, 5(1), 111-117.
- FAOSTAT 2018 <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> [Son erişim tarihi 03.09.2020]
- Fidan, H. 2020. Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV): Güncel durumu ve geleceği. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 33(1), 43-49.
- Fidan, H., 2010. Sarımsak, Soğan ve Pırasadaki Virüs Hastalıklarının Saptanması ve Taşköprü 56 Sarımsak Tipinin En Yaygın Virüse Karşı Reaksiyonunun Belirlenmesi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi/ADANA, 163 s.
- Fidan, H., Barut, M. 2019. Biber hafif benek virüs'üne (PMMoV) karşı L4 dayanıklılık durumunun taranması ve moleküler yöntemlerle karakterizasyonu. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 32(3), 1-1.

- Fidan, H., Karacaoglu, M., Koc, G., Caglar, B. K. 2019. Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) strains and epidemiological role of Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae) biotypes on tomato agroecology in Turkey. *Applied Ecology and Environmental Research*, 17(4), 9131-9144.
- Fidan, H., Sarı, N. 2018. Domateste Tomato spotted wilt virüs'üne karşı dayanıklılığı kıran izolatının fenotipik karakterizasyonu. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 32(3), 1-1.
- Fidan, H., Sarıkaya, P. 2020. Antalya ili patlıcan (Solanum melongena) yetiştiriciliğinde sorun olan virüs hastalıkları. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 33(1), 27-35.
- Fidan, H., Sarıkaya, P., Yıldız, K., Topkaya, B., Erkiş, G., Calış, O. 2020. JIA-2020-0577. *Journal of Integrative Agriculture*, 0.
- Fortes, I. M., Moriones, E., Navas-Castillo, J. 2012. Tomato chlorosis virus in pepper: prevalence in commercial crops in southeastern Spain and symptomatology under experimental conditions. *Plant Pathology*, 61(5), 994-1001.
- Fox, A., Lloyd, S., 2018. Pepper Vein Yellows Viruses (PeVYVs). <https://planthealthportal.defra.gov.uk/assets/factsheets/PeVYVs-PestFactsheet.pdf> [Son erişim tarihi 28.10.2020]
- Ghosh, S., Kanakala, S., Lebedev, G., Kontsedalov, S., Silverman, D., Alon, T., Mawassi, M. (2019). Transmission of a new polerovirus infecting pepper by the whitefly Bemisia tabaci. *Journal of virology*, 93(15), e00488-19.
- Govindarajan, V. S., Salzer, U. J. 1986. Capsicum production, technology, chemistry, and quality. Part III. Chemistry of the color, aroma, and pungency stimuli. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 24(3), 245-355.
- Gürsu, E. Sars-CoV-2 2020. Virüsüne Genel Bakış. Biyomühendislik bölümü öğrencisi, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, 16 s.
- ICTV 2011. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/266/luteoviridae-figures [Son erişim tarihi 29.10.2020]
- Kamran, A., Lotos, L., Amer, M. A., Al-Saleh, M. A., Alshahwan, I. M., Shakeel, M. T., Katis, N. I. 2018. Characterization of Pepper leafroll chlorosis virus, a new polerovirus causing yellowing disease of bell pepper in Saudi Arabia. *Plant disease*, 102(2), 318-326.
- Knierim, D., Deng, T. C., Tsai, W. S., Green, S. K., Kenyon, L. 2010. Molecular identification of three distinct Polerovirus species and a recombinant Cucurbit aphid-borne yellows virus strain infecting cucurbit crops in Taiwan. *Plant pathology*, 59(5), 991-1002.
- Knierim, D., Tsai, W. S., Kenyon, L. 2013. Analysis of sequences from field samples reveals the presence of the recently described pepper vein yellows virus (genus Polerovirus) in six additional countries. *Archives of virology*, 158(6), 1337-1341.
- Kumar, S., Udaya Shankar A.C., Nayaka S.C., Lund O.S., Prakash H.S., 2011. Detection of Tobacco mosaic virus and Tomato mosaic virus in pepper and tomato by multiplex RT-PCR. *Lett Appl Microbiol.* 2011 Sep;53(3):359-63. doi: 10.1111/j.1472-765X.2011.03117.x. Epub 2011 Aug 2.

- Krug, H., 1986. Gemüseproduktion. Ein Lehr-und Nachschlagewerk für Studium und Praxis. Verlag Paul Parey. Berlin und Hamburg, pp. 446 s.
- Lecoq, H., Bourdin, D., Wipf-Scheibel, C., Bon, M., Lot, H., Lemaire, O., Herrbach, E. 1992. A new yellowing disease of cucurbits caused by a luteovirus, cucurbit aphid-borne yellows virus. *Plant Pathology*, 41(6), 749-761.
- Lee, J. 2019. Development and Evolution of Molecular Markers and Genetic Maps in Capsicum Species. *Biochemistry and Cell Biology of Ageing: Part I Biomedical Science*, 85–103.
- Liu, M., Liu, X., Li, X., Zhang, D., Dai, L., Tang, Q. 2016. Complete genome sequence of a Chinese isolate of pepper vein yellows virus and evolutionary analysis based on the CP, MP and RdRp coding regions. *Archives of virology*, 161(3), 677-683.
- Lotos, L., Efthimiou, K., Maliogka, V. I., Katis, N. I. 2014. Generic detection of poleroviruses using an RT-PCR assay targeting the RdRp coding sequence. *Journal of virological methods*, 198, 1-11.
- Lotos, L., Olmos, A., Orfanidou, C., Efthimiou, K., Avgelis, A., Katis, N. I., Maliogka, V. I. 2017. Insights into the etiology of polerovirus-induced pepper yellows disease. *Phytopathology*, 107(12), 1567-1576.
- Maina, S., Edwards, O. R., Jones, R. A. 2016. First complete genome sequence of Pepper vein yellows virus from Australia. *Genome Announcements*, 4(3).
- Murakami, R., Nakashima, N., Hinomoto, N., Kawano, S., Toyosato, T. 2011. The genome sequence of pepper vein yellows virus (family Luteoviridae, genus Polerovirus). *Archives of virology*, 156(5), 921-923.
- Murakami, R., Kawano, S. 2017. A natural host and diversity of Pepper vein yellows virus in Japan. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 51(1), 59-68.
- NPPO 2016. <https://pra.eppo.int/getfile/9a59d6ce-cbf5-4e82-9578-b3028f59b947> [Son erişim tarihi 02.11.2020]
- Nyana, I. D. N., Lestariningsih, M. T., Adnyani, N. N. P., Suastika, G. 2016. Identifikasi Pepper vein yellows virus yang Berasosiasi dengan Penyakit Yellow Vein Banding pada Tanaman Mentimun di Bali. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*, 12(4), 109.
- Oğuzkan, S. B., Can, M., Kılıç, H. İ., Uğraş, H. İ., Özaslan, M. 2018. Güneydoğu anadolu bölgesinde yetişen yeşil acı biberlerdeki kapsaisinin dna koruyuculuğu üzerine etkisi. *Tarım ve Doga Dergisi*, 21(1), 26.
- Pagán, I., Holmes, E. C. 2010. Long-term evolution of the Luteoviridae: time scale and mode of virus speciation. *Journal of Virology*, 84(12), 6177-6187.
- Tomassoli, L., Manglli, A., Ahmad, A., Tiberini, A., & Barba, M. 2016. First report of Pepper vein yellows virus infecting chilli pepper (*Capsicum* spp.) in Italy. *New Disease Reports*, 33, 22-22.
- TÜİK 2019. <https://data.tuik.gov.tr/tr/main-category-sub-categories-sub-components2/> [Son erişim tarihi 29.10.2020]

- Villanueva, F., Castillo, P., Font, M. I., Alfaro-Fernández, A., Moriones, E., Navas-Castillo, J. 2013. First report of Pepper vein yellows virus infecting sweet pepper in Spain. *Plant Disease*, 97(9), 1261-1261.
- Yonaha, T., Toyosato, T., Kawano, S., Osaki, T. 1995. Pepper vein yellows virus, a novel luteovirus from bell pepper plants in Japan. *Japanese Journal of Phytopathology*, 61(3), 178-184.
- Zencirkıran, M. 2014. Doğu Akdeniz bölgesi biber alanlarında *Biber Sarı Yaprak Kıvrıcıklık Virüsü*'nün yaygınlığının belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Sütçü İmam Üniversitesi, Kahramanmaraş, 37 s.
- Zhang, S. B., Zhao, Z. B., Zhang, D. Y., Liu, Y., Zhang, S. B., Zhang, D. Y., Peng, J. 2015. First report of Pepper vein yellows virus infecting red pepper in Mainland China. *Plant Disease*, 99(8), 1190-1190.



8. EKLER

EK.1. Dellaporta yöntemi ile Total Nükleik Asit protokolü

- 1- 100-400 mg örnek, 1.2 ml ekstraksiyon buffer (100 mM Tris, pH 8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol)'da ezilmiştir.
 - 2- Ezilmiş örnekten 600 µl alınıp 1.5 ml'lik tüplere konulmuştur. Üzerine %10'luk SDS'den 70 µl eklenip 65 °C'de 10 dk bekletilmiştir. Bekleme esnasında tüpler bir veya iki kez karıştırılmıştır.
 - 3-200 µl 5 M potasyum asetat, tüplere eklendikten sonra buzda 10 ila 30 dakika arasında bekletilmiştir.
 - 4- Buzdan alınan örnekler 10 dk 10.000 rpm'de santrifüj edilmiş, sıvı kısımdan 600 ml alınarak yeni 1.5 ml'lik tüplere konulmuştur.
 - 5- 300 µl soğuk izopropanol eklenerek 25-30 dk buz içinde bekletilmiştir.
 - 6- 10 dk 10.000 rpm'de santrifüj edilmiş, süpernatant (sıvı) dikkatlice ortamdan uzaklaştırılmıştır.
 - 7- -20 °C de saklanan soğuk %70'lik etanol den 750 µl pellete eklenip kibarca karıştırılmıştır.10 dk 10.000 rpm'de santrifüj yapılmıştır.
 - 8- Çökelti üzerinde kalan sıvı, tüplerden dikkatlice uzaklaştırılmış, 15 sn'lik kısa bir santrifüj daha yapıldıktan sonra alkol, pipetle çekilmiştir.
 - 9- Pellet 10 dk kurutulmuş, üzerine 400 µl steril distile su eklenerek karıştırılmıştır.
 - 10- 37 °C'de 15 dk. inkübe edilmiş ve inkübasyon sırasında bir iki kez hafifçe karıştırılmıştır.
 - 11- Elde edilen total nükleik asitten 5-10 µl alınıp elektroforez sonuç kontrolünden sonra -20 °C ya da -80 °C'de saklanmıştır.
- Not: Ekstraksiyon çözeltisi kullanmadan kısa bir süre önce ve steril ortamda hazırlanmıştır (Tris, NaCl ve EDTA.)

EK. 2. Total Nükleik Analizlerinde Kullanılan Çözelti ve Solusyonlar**1. Ekstraksiyon tamponu**

Aşağıda belirtilen miktardaki kimyasallar 150 ml steril saf su içerisinde manyetik karıştırıcıda çözünmüş ve pH'sı ayarlanarak 200 ml tamamlanmıştır. Daha sonra 1/1000 v/v oranında 2.B. Mercaptoethanol ilave edilmiştir. (100 mM Tris-HCl (pH: 8.0), 50 mM EDTA (pH:7,0), 500 mM NaCl, 10 mM 2.B. Mercaptoethanol).

Tris- HCl 2.422gr

EDTA 3,722 gr

NaCl 5,844 gr

2. %20 SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) 20 gr SDS tartılmış ve 80 ml steril saf su içerisinde ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda çözdürülmüştür. Daha sonra saf su ilave edilerek 100 ml tamamlanmış ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3. 5 M Potasyum Asetat (CH₃COOK) 60 ml steril saf su içerisinde 49,07 gr potasyum asetat çözdürülmüş ve daha sonra 100 ml'ye tamamlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

4. 3M Sodyum Asetat (CH₃COONa) 60 ml steril saf su içerisinde 40,82 gr sodyum asetat çözdürülmüş ve daha sonra 100 ml'ye tamamlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

5. %70 lik ETOH %99 Ethanol'den 707 ml alınarak 293 ml saf su ilave edilmiş ve hazırlanan bu %70 ETOH +4 °C'de kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir.

EK.3. Moleküler çalışmalarda kullanılan tampon çözeltiler**TAE buffer (Tris + Asetik asit+ EDTA) pH:8,3**

50 X TAE 1 lt için. 242 gr Tris 57,1 ml Glical Asetik asit 100 ml EDTA (pH: 8,0)

TE Buffer (Tris +EDTA) pH:7,4

100 mM Tris (pH:7,4) 10 mM EDTA (pH) 8,0)

0,5 M EDTA pH:8,0

186,1 gr /lt (Otoklav edilmeli)

1 M Tris pH:8,0

121,1 gr tris/lt (Otoklav edilmeli)

TBE (Tris + Borik asit + EDTA) pH:8,3

108 gr tris 55 gr Borik asit 40 ml 0,5 M EDTA

EK. 4. Agaroz jel elektroforez yöntemi

1. Cam erlen içerisine 0,90 gram agaroz tartılmış ve üzerine 60 ml 1X TAE (EK 3) tampon ilave edilmiştir. Bu karışım mikro dalga fırında tamamen eriyinceye kadar ısıtılmış, eriyen karışım 100 ml olacak şekilde TAE tampon çözeltisi ile tamamlanmış.
2. Jel tankı hazırlanarak tarak takılmış ve jel elektroforez tankına dökülmüştür. Oda sıcaklığında bekletilen jel 15-20 dk içerisinde tamamen donduktan sonra tarak çıkarılarak jel aparatı ile birlikte elektroforez tankına yerleştirilmiştir.
3. 1X TAE tamponu jelin üzerini 1-2 mm kaplayacak şekilde elektroforez tankının içerisine doldurulmuştur. Örnekler 10 µl PCR ürünü ile 2 µl 6X yükleme tamponu (Loading Dye) olacak şekilde toplam 12 µl'lik karışım jeldeki kuyucuklara mikropipetle yerleştirilmiştir. Örnekler yerleştirildikten sonra 6 µl markır en sağdaki çukura gelecek şekilde yerleştirilmiş ve sağdaki en son çukura ise negatif kontrol konulmuştur.
4. Tank kapağı kapatılarak güç kaynağı açılmış 50-70 V elektrik ortamında jel koşulmuştur. Markırda yer alan mor bandın jelde son 1 cm alan kalıncaya kadar ilerlemesi sağlanmış ve bu aşamada işleme son verilmiştir.
5. İşlemin sonunda tanktan alınan jel oda sıcaklığında Ethidium bromide ile boyanmış ve daha sonra UV-translminatörde görüntülenmiştir.

ÖZGEÇMİŞ



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2018-2020	Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Bölümü, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2013-2017	Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Antalya

ESERLER

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

- 1- Serçe C., Fidan H., Sarıkaya P., Sarı N. (2017). Virüs vektörü tek bir beyazsinekten virüs, biyotip ve endosimbiont ilişkisinin belirlenmesi. 6. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi (Sözlü sunum)