

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**BİBERDE BAZI VİRAL KAYNAKLI  
HASTALIKLARA KARŞI DAYANIKLILIĞIN  
ARAŞTIRILMASI**

**Duygu GÖKSU**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hülya İlbi**

**Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı**

**Bilim Dalı: 501.01.03**

**Sunuş Tarihi: 07.09.2016**

**Bornova-İZMİR**

**2016**



**Duygu GÖKSU** tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan "**Biberde Bazı Viral Kaynaklı Hastalıklara Karşı Dayanıklılığın Araştırılması**" başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 07.09.2016 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**İmza**

**Jüri Başkanı : Prof. Dr. Hülya İlbi**

**Raportör Üye :**

**Üye :**



# EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

## ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum "**Biberde Bazı Viral Kaynaklı Hastalıklara Karşı Dayanıklılığın Araştırılması**" başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlamasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

07/09/2016

**Duygu GÖKSU**



**ÖZET****BİBERDE BAZI VİRAL KAYNAKLI HASTALIKLARA KARŞI  
DAYANIKLILIĞIN ARAŞTIRILMASI**

GÖKSU, Duygu

Yüksek Lisans Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hülya İlbi

Eylül 2016, 45 sayfa

Biber (*Capsicum spp.*) dünyada üretimi en çok yapılan aromatik sebzelerden biridir ve bu özelliği ile dünya yiyecek endüstrisinde önemli bir rol oynar. Ülkemizde yaş meyve ve sebze üretiminde önemli bir paya sahip olan biber yetiştiricilerinde üreticilerin karşılaştığı en büyük sorunlardan biri çok önemli verim kayıplarına yol açan viral hastalıklarla mücadele zorluğudur. Bu hastalıklardan Tütün Mozaik Virüsü (TMV), Patates Y Virüsü (PVY) ve Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV) mücadelesi en zor olanlardır. Yeni alternatif çözümler üretilen virüslerle mücadelede en etkili çözüm dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesidir.

Bu tez projesinde temel amaç, moleküler işaretleyiciler kullanılarak tohum firmalarına ait saf ve ileri biber hatlarında TMV, PVY ve TSWV viral hastalıklara karşı dayanıklı lokusların tespit edilmesidir. Böylece ileride bu hastalıklara karşı yürütülen dayanıklılık ıslahı programlarında gen piramidi çalışmalarına temel oluşturmak istenmektedir. Dayanıklı çeşit geliştirme faaliyetlerinde bulunan firmaların mevcut hatları, moleküler teknikler kullanılarak söz konusu hastalıklara dayanıklılık bakımından test edilerek ıslahta seleksiyon gerçekleştirilmiştir. Moleküler tekniklerin ıslahta kullanılması hem klasik ıslah yöntemlerine göre daha kısa sürede istenen sonuca ulaşma hem de ıslahçılara ileriki çalışmalarında biberde gen piramidi oluşturma imkânı sağlamaktadır.

**Anahtar sözcükler:** Biberlerde Viral Hastalıklar, Tütün Mozaik Virüsü (TMV), Patates Y Virüsü (PVY), Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV)



**ABSTRACT****SCREENING OF PEPPER LINES FOR RESISTANCE TO  
VIRAL DISEASES****GÖKSU, Duygu**

MSc in Horticulture Sciences

Supervisor: Prof. Dr. Hülya İlbi

September 2016, 45 pages

Pepper growers have an most important market in Turkey which is of fruit and vegetable production countries. The most difficult diseases are: Cucumber Mosaic Virus (CMV), Tabocco Mosaic Virus (TMV), Potato Virus Y (PVY) ve Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV). The resistant varities are the most effective alternative solution in the struggle against viruses. The main goal of this study to develop pepper varieties which have several resistant genes (gene pyramiding) by using MAS.

Pure and breeding lines that were obtained from seed companies have been examined by molecular markers linked to genes confers resistance to Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV), Potato Virus Y (PVY), Tomato Mosaic Virüs (TMV). As these lines have been scanned for the pathogen resistance, they have been appraised by their yield and quality performances as well.

Using moleculer markers in breeding, helps to reduce time and consuming and also to develop pepper varieties which have several resistant genes (gene pyramiding).

**Keywords:** Pepper, Viral Diseases, Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV), Potato Virus Y (PVY), Tomato Mosaic Virüs (TMV).



## TEŞEKKÜR

Bu çalışmada her aşamada değerli görüş ve bilgileriyle yön veren ve çalışma süresince yönlendirici desteğini esirgemeyen, tez konumun belirlenmesinde ve çalışmam süresince değerli katkılarını ve sabrını esirgemeyen danışman hocam, sayın Prof. Dr. Hülya İlbi'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin laboratuvar aşamalarının yürütülmesine olanak sağlayan Tohum Teknolojisi ve Araştırma Merkezi (TOTEM) Müdürlüğü'ne teşekkür ederim. Ayrıca, çalışmanın finansal desteğini sağlayan Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı, Lider Tohum ve AD-ROSSEN tohum firmaları yetkililerine teşekkür ederim.

Tezimin laboratuvar çalışmalarında benimle birlikte çalışan moleküler biyoloji laboratuvar arkadaşlarım Ali Kün ve Damla Kantürer'e teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen anneme ve eşime özellikle teşekkür ederim.



**İÇİNDEKİLER**

	Sayfa
ÖZET.....	vii
ABSTRACT .....	ix
TEŞEKKÜR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xix
1. GİRİŞ .....	1
2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ.....	5
2.1 Tütün Mozaik Virüsü (TMV).....	9
2.1.1 Belirtileri .....	9
2.1.2 Yayılışı ve Mücadele Yöntemleri .....	10
2.1.3 Dayanıklılık Mekanizması, Genleri ve Moleküler Markör Çalışmaları.....	11
2.2 Patates Y Virüsü (PVY) .....	12
2.2.1 Belirtileri .....	12
2.2.2 Yayılışı ve Mücadele Yöntemleri .....	13
2.2.3 Dayanıklılık Mekanizması, Genleri ve Moleküler Markör Çalışmaları.....	14
2.3 Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV).....	15
2.3.1 Belirtileri .....	15

2.3.2 Yayılışı ve Mücadele Yöntemleri.....	16
2.3.3 Dayanıklılık Mekanizması, Genleri ve Moleküler Markör Çalışmaları	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	19
3.1 Materyal.....	19
3.1.1 Bitkisel Materyal .....	19
3.1.2 DNA izolasyonu .....	20
3.1.3 PCR Yöntemine Dayalı Analizler .....	22
3.1.3.1 TMV hastalığına dayanıklılık analizleri .....	22
3.1.3.2 PVY hastalığına dayanıklılık analizleri .....	25
3.1.3.3 TSWV hastalığına dayanıklılık analizleri.....	28
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	33
4.1 TMV Hastalığı Testlemeleri.....	33
4.2 PVY Hastalığı Testlemeleri.....	35
4.3 TSWV Hastalığı Testlemeleri .....	37
5. SONUÇ.....	39
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	41
ÖZGEÇMİŞ.....	45

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. TMV belirtileri (Tarım Köy İşleri, 2009).....	9
2.2. Biber meyvelerinde PVY belirtileri (Çelik ve ark., 2012). ....	12
2.3. TSWV belirtileri (Tarım Köy İşleri, 2009). ....	15
3.1. Ekstraksiyon sonrası DNA'ların jeldeki görüntüsü. ....	21
3.2 060I2END SCAR ve 087H3T7 CAPS markörlerinin lokasyonları (Yang et al. 2009).. ....	23
3.3. Pvr4 genine ait CSO jel görüntüleri . ....	27
3.4. SCAC568 markörü (Moury ve ark., 2000).. ....	29
3.5. TSWV Taq1 Kesim Sonrası Jel Görüntüsü. (D: Dayanıklı, H: Hassas, He: Heterozigot). ....	31
4.1. L3 primer PMFR11 Kesim Sonrası Jel Görüntüsü. (D: Dayanıklı, H: Hassas, He: Heterozigot). ....	34
4.2. Kesim Sonrası Jel Görüntüsü. (D: Dayanıklı, H: Hassas, He: Heterozigot). ....	34
4.3. Pvr4 genine ait CSO BATEM jel görüntüsü. (D: Dayanıklı, H: Hassas, He: Heterozigot). ....	36
4.4. TSWV Taq1 Kesim Sonrası Jel Görüntüsü.....	38



**ÇİZELGELER DİZİNİ**

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. CTAB ekstraksiyon buffer içeriği. ....	20
3.2. Moleküler markörlerin dayanıklı ve hassas bireylerde verdiği band seviyeleri.....	22
3.3. Markörlere ait gen dizilimleri (Sugita ve ark., 2004; Yang ve ark., 2009).....	23
3.4. L3 ve L4 genleri için uygulanan PCR miksi.....	23
3.5. PMFR11, 060I2END ve 087H3T7 markörleri için uygulanan PCR programları. ....	24
3.6. L4 markörü için uygulanan kesim protokolü.....	24
3.7. Moleküler markörlerin dayanıklı ve hassas bireylerde verdiği band seviyeleri.....	25
3.8. Markörlere ait gen dizilimleri (Caranta ve ark., 1999). ....	25
3.9. Pvr4 geni için uygulanan PCR miksi. ....	26
3.10. CSO markörleri için uygulanan PCR programları.....	26
3.11. CSO markörü için uygulanan kesim protokolü.....	27
3.12. Moleküler markörlerin dayanıklı ve hassas bireylerde verdiği band seviyeleri.....	28
3.13. Markörlere ait gen dizilimleri (Moury ve ark., 2000). ....	28

**ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)**

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.14. Tsw geni için uygulanan PCRmiksi. ....	29
3.15. SCAC568 markörü için uygulanan PCR protokolü. ....	30
3.16. L4 markörü için uygulanan kesim protokolü. ....	30
4.1. Testlemeye alınan firma hatları ve TMV sonuçları. ....	34
4.2. Testlemeye alınan firma hatları ve PVY sonuçları. ....	36
4.3. Testlemeye alınan Firma hatları ve TSWV sonuçları. ....	38
5.1. Firmalar tarafından proje süresince geliştirilen TSWV'ye karşı dayanıklılık geni taşıyan çeşitler ve özellikleri. ....	39
5.2. Firmalardan alınarak testlenen hat sayıları ve dayanıklılıkları. ....	40

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<b><u>Kısaltmalar</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
AFLP	Amplicon Length Polymorphism
AMV	Alfalfa Mosaic Virus
ARS	Agricultural Research Service
AVRDC	Dünya Sebze Merkezi
BATEM	Batı Akdeniz Araştırma Enstitüsü
bp	base pair
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequences
CMV	Cucumber Mosaic Virus
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
DNA	Deoksiribonükleik Asit
MAS	Marker Assisted Selection
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMMoV	Pepper Mild Mottle
PRSV	Pepper Ringspot Virus
PVMV	Pepper Veinal Mottle Virus
PVY	Potato Y Virus
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**

<b><u>Kısaltmalar</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
SCAR	Sequenced Characterized Amplified Regions
TEV	Tobacco Etc Virus
TMV	Tobacco Mosaic Virus
ToMV	Tomato Mosaic Virus
TSWV	Tomato Spotted Wilt Virus

## 1. GİRİŞ

1500'lü yıllarda Kristof Kolomb tarafından Avrupa'ya getirilen biberin anavatanı Amerika'dır. Biber, tropikal ve subtropikal iklim koşullarını daha çok sevse de günümüzde Antartika hariç tüm kıtalardaki ülkelerde yaygın olarak üretilen-tüketilen ve birçok farklı şekilde kullanılan bir kültür bitkisidir (Duman ve ark., 2002). Endüstri açısından değeri yadsınamayacak derecede bir bitki olan biber, 16. yüzyılda İstanbul'a geldiği ve ardından diğer bölgelerimize yayıldığı belirtilmektedir (Çelik ve ark, 2013). Günümüzde biber üretiminde Türkiye kayda değer bir potansiyele sahiptir. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) ile Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)'nun araştırmaları Türkiye'nin biber üretiminde dünya ülkeleri arasında başı çektiğini göstermektedir. Türkiye'de biber üretimi 1900 yılında 900 ton iken, 2000 yılında 1480 tona yükselmiş, 2011 yılında dünyada üretilen 24 milyon ton biberin 875 269 ton üretimini gerçekleştirerek Çin ve Meksika'dan sonra üçüncü sıraya yerleşmiştir (FAO, 2011; Özalp, 2010).

Aromatik bir bitki olan biber, mutfakta taze, dondurularak, kurutulularak, konserve, salça ya da baharat şeklinde, yemeklerde, hazır gıdalarda, kızartmalarda, turşularda, soslarda kullanımının yanı sıra boya ve ilaç sanayinde de önemli bir yere sahiptir (Kılıç ve ark., 2015). Bütün meyve sebzelerin üretimiyle karşılaştırıldığında da biberin Türkiye'de en yüksek üretim oranına sahip sebzelerden biri olması ve üretim miktarının yıllara göre artış göstermesi dikkat çekmektedir. Ancak dünya çapında tarıma en elverişli ülkelere göre Türkiye'nin de tarım arazilerinin zamanla azaldığı görülmektedir. Dünyada ve ülkemizde nüfus yoğunluğu, sanayileşme kentleşme gibi nedenlerle artan yeterli ve dengeli beslenme sorununa, azalan tarım alanları da eklenince durumun daha da karmaşık bir hal aldığı söylenebilir (Akbaş ve ark., 2005). Böyle bir sorunla mücadelede en etkili yollardan biri ekili arazilerden en yüksek verimin elde edilmesidir. Verimin en yüksek düzeyde tutması için ise kayıpların azaltılması gerekir. Ürün ve kalite kayıplarının en büyük nedenleri arasında fungal, bakteriyel ve viral hastalıklar bulunmaktadır. Bu hastalıkların dünya çapında her yıl yaklaşık 60 milyar dolar ürün kaybı meydana getirdiği tahmin edilmektedir. Önlem alınmazsa ekili ürünlerin tamamının kaybına neden olabilecek dereceye gelebileceği bilinmektedir (Şevik, 2015).

Bu hastalıklarla baş etmenin zorluğu, hasta bitkilerin getirdiği ekonomik ve ticari kayıp, mücadele için harcanan zaman ve güç, yöntemin zayıflığı nedeniyle bitki ve tohum kalitesindeki düşüş, uluslararası arenadaki rekabet gücünü zayıflatması gibi birçok farklı yönden kendini gösterir (Çelik ve ark., 2013). Öyle ki, bazı virüs hastalıkları nedeniyle bazı bölgelerde üretilen ürünlerin üretiminden vazgeçilmektedir. Kısacası geniş açıdan bakıldığında kayıpların yalnız bitki düzeyinde kalmadığı çok daha geniş kapsamlı zararlara yol açtığı görülmektedir. Dolayısıyla bu durum viral hastalıklardan kaynaklanan kayıplara karşı önlem alınması ve kaybın en aza indirilmesi için etkili mücadelelerin geliştirilmesinin zorunluluğunu açıkça yansıtmaktadır (Şevik, 2015).

Biberlerde görülen fungal, bakteriyel ve viral hastalıklar arasında mücadelesi en zor olan virüslerin sebep olduğu viral hastalıklardır. Viral hastalıklarla mücadelede yapılması gereken ilk şey önlem almak ve virüsün bölgeye girişini engellemektir. Virüs bulaşmış bitkiler varsa tespit etmek ve sağlıklı olanlardan ayıklamak gerekir. Bu, diğer bölgelere ve bitkilere bulaşmasını ve yayılmasının önlenmenin yollarından biridir. Hastalıklarla mücadelede geliştirilen farklı yöntemlerden üreticilerin ilk aklına gelen kimyasal mücadele yöntemidir. Ancak bölgenin virüsten tamamen arınması için kimyasal yollara başvurulması ne yazık ki virüsler için etkili bir yol değildir. Diğer zararlıların aksine pestisitlerle kontrolü olmayan virüs hastalıkları için farklı kültürel mücadele yöntemleri geliştirilmektedir. Bunların başında termoterapi ve doku kültürü gibi yöntemlerle elde edilen (Yeşil ve Ertunç, 2012) virüsten arı bitkilerle üretim yapılması, münavebe, sanitasyon, eradikasyon, dezenfeksiyon, üretim alanların birbirinden ayrılması, vektör bulunmayan alanlarda üretim yapılması, virüs taşıyıcı vektörlerle kimyasal veya kimyasal olmayan mücadele edilerek bitkiden bitkiye taşınmasının önlenmesi, ıslah ve moleküler biyoloji teknikleri ile virüse dayanıklı bitkilerin elde edilmesi gelmektedir (Şevik, 2015). Tüm bunlara rağmen viral hastalıklar nedeniyle yaşanan çok büyük ürün kayıpları, biberlerde virüslere karşı dayanıklılığın artırılması çalışmalarının başlamasına yol açmıştır. Biberlerde virüslere karşı yapılan çalışmalar ile dayanıklılığın geliştirilmesi ise oldukça etkin, en ekonomik ve en kolay yöntemdir (Çelik ve ark., 2013).

Dünya çapında tarla şartlarında henüz tanımlanamayanların yanında farklı guruplara mensup yaklaşık 55 virüsün bitkileri enfekte ettiği kaydedilmiştir. Türkiye'nin birçok farklı bölgesindeki ekim alanlarında biberlerde görülen hastalıklarla ilgili birçok farklı çalışma yapılmaktadır. Yapılan çalışmalarda varlığı tespit edilen TMV, CMV, PVY, TEV ve TSWV en çok verim kaybına neden olan virüsler olarak kendini göstermektedir (Bostan ve Dursun, 2002).

Tez kapsamında, bu virüslerden TMV, PVY ve TSWV'ye karşı dayanıklılık sağlayan genler ile ilişkili moleküler markörler kullanılarak dayanıklı hatların/çeşitlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Firmaların gen havuzunda bulunan biber hatlarının söz konusu virüslere karşı dayanıklılık sağlayan genlerden birini veya daha fazlasını içerenlerin belirlenerek, ıslah programının oluşturulmasında Firmalara yön verilmesi sağlanmaya çalışılmıştır.



## 2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ

Çiçekliler (*Fenerogon*) şubesinin, kapalı tohumlular (*Angiospermae*) alt şubesinin, çift çenekliler (*Dicotyledoneae*) sınıfının, bileşik taç yapraklılar (*Simpetal*) alt sınıfının, patlıcangiller (*Solanaceae*) familyasının *Capsicum* cinsine ait olan biberin, genel olarak dünya çapında 25 *Capsicum* türünün var olduğu bilinmektedir. En yaygın olan beş tür; *Capsicum annuum* L., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum chinense*, *Capsicum pendulum* ve *Capsicum pubescens*'dir (Yaldız, 2008).

Biber yetiştiriciliğinde üretimi kısıtlayan ve her yıl ciddi ürün kayıplarına neden olan 506 hastalık, zararlı ve yabancı ot bulunmaktadır (KKGM, 2010). Bunlar arasında mücadelesi en zor olanlar virüslerdir. Dünya genelinde biber üretimini verimde ve kalitede negatif yönde etkileyen virüslerin benzer türler arasında kolayca bulaştığı görülmektedir. Green ve Kim (1994)'in hastalık oluşturduğunu belirttiği yaklaşık 65 farklı virüs grubuna dahil olan ve biberlerde en ciddi verim kayıplarına neden olan başlıca virüsler şunlardır: Tütün Mozaik Virüsü (TMV - *Tobacco Mosaic Virus*), Hıyar Mozaik Virüsü (CMV - *Cucumber Mosaic Virus*), Patates Y Virüsü (PVY - *Potato Y Virus*), Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV - *Tomato Spotted Wilt Virus*), *Tomato Mosaic Virus* (ToMV), *Alfalfa Mosaic Virus* (AMV), *Pepper Mild Mottle* (PMMoV), *Pepper Veinal Mottle Virus* (PVMV), *Pepper Ringspot Virus* (PRSV) (Kılıç ve ark., 2015). Ülkemizde meyve ve sebze üretiminde önemli paya sahip olan biber yetiştiriciliğinde üreticilerin karşılaştığı en büyük sorunlardan biri virüs kaynaklı hastalıklardır. Türkiye'de de farklı bölgelerdeki ekim alanlarında yapılan çalışmalarda biberlerde TMV, CMV, PVY, TEV, ToMV, PMMoV, TSWV, PVY, AMV belirlenmiştir (Bostan ve Dursun, 2002).

Viral hastalıklarla mücadelenin zorluğu ve etkin yöntemlerin azlığı nedeniyle yeni alternatif çözümler üretilmektedir. Bu alternatifler arasında bitkilerin dayanıklılığının arttırılması ve üretimde dayanıklı çeşit kullanımı en etkili ve çevreci çözüm olarak görülmektedir (Yeşil ve Ertunç, 2012).

Virüsler tarafından enfekte edilemeyen bitkiler, dayanıklı bitkilerdir. Bu bitkiler bağımsız oldukları hastalığa asla yakalanmazlar. Virüs konukçusu olan ve enfekte edilebilir bitkiler ise dayanıklı, tolerant, duyarlı ve aşırı duyarlı olmak üzere kendi içinde dört sınıfa ayrılır. Duyarlı bitkiler, virüsün kolayca çoğalabildiği ve saldırdığı bitkilerdir. Aşırı duyarlı bitkiler, enfeksiyona şiddetli tepkiler verirler. Tolerant bitkiler enfeksiyon sonrası az bir etki gözlenen ve bu zararın belirli bir düzeyde kaldığı, yüksek ekonomik zarara dönüşmediği bitkilerken, dayanıklı bitkiler, virüs saldırısını ve replikasyonunu sınırlandırmış bitkilerdir (Çandar ve Erkan, 2011). Dayanıklılık bitkide kalıtsal ya da sonradan kazanılmış bir özellik olabilir. Hastalıkla karşılaşan bitki patojene karşı koyarak durumu kendi lehine çevirebilir (İlbağı ve Çıtır, 2006).

Bitkilerin dayanıklılığı yapısal, biyokimyasal ve genetik özelliklere göre ortaya çıkmaktadır. Örneğin kalın bir kütüküla tabakası, tüylü bir yaprak yüzeyi ya da kalın bir epidermis hücresi gibi özellikler bitkiyi virüsün taşıyıcısı olan vektöre karşı koruyabilmektedir. Bitkinin fizyolojik olarak meydana getirdiği tepkileri içeren bu tür özellikler yapısal dayanıklılığa girmektedir (Çandar ve Erkan, 2011). Bitkinin biyokimyasal dayanıklılığı ise bitkinin virüs girişini engelleyen bazı molekülleri sentezlemesiyle ilgilidir. Bitki bu biyokimyasal molekülleri enfeksiyondan önce doğal olarak sentezliyor olabileceği gibi enfeksiyondan sonra hastalığa karşı koruyucu bir tepki olarak tetiklenmesiyle de sentezi başlatılmış olabilir (Yeşil ve Ertunç, 2012). Uyarılmış dayanıklılık da denen bu mekanizma bitkinin kendi doğal savunma mekanizması olduğu için sağlığa ve çevreye olumsuz etkisi yoktur (Arıcı ve Yardımcı, 2001). Genetik dayanıklılık ise ıslah ve genetik mühendisliği çalışmalarıyla nesilden nesle aktarılan bir yöntemdir (Çandar ve Erkan, 2011).

DNA, bütün canlılarda hayatsal olayların şifresini taşır ve hücrelerin kontrol merkezidir. Canlının fenotipi, morfolojik değişiklikleri, metabolik fonksiyonları, moleküler bileşenleri DNA tarafından kontrol edilir. Bitki hastalıklarında bitki ile patojen arasındaki etkileşimi de belirleyen DNA'nın özellikleridir. Dayanıklılığın derecesi bitki ile patojen arasındaki etkileşime ve dayanıklılığın yönetildiği gen sayısına bağlıdır. Uzun süreli etkileşimler sonucunda dayanıklılık ve duyarlılık derecesine bağlı olarak bitkiler yeni çeşitler oluştururken, virüsler yeni ırklar

oluşturmaktadır. Dolayısıyla belirli bir virüse karşı oluşturulan dayanıklı bitki türlerinin ileride daha güçlü virüs ırkları tarafından enfekte edilebileceği yüksek olasılıklıdır. Yine de gelişen genetik mühendislik yöntemler sayesinde üretilen mekanizmalar daha kontrollü bir biçimde bitkilerin lehine kullanılabilir (İlbağı ve Çıtır, 2006).

Mendel'in 1866 yılında yaptığı çalışmalara dayanan yeni çalışmalar bitkilerin kalıtsal özelliklerinden bilinçli bir şekilde faydalanmanın yolunu açmıştır. Birçok bitki türündeki genetik çeşitliliğin azlığı nedeniyle yerel ve yabancı akrabalardan dayanıklılığı sağlayan uygun genler geliştirilen tekniklerle elde edilip kültür bitkilerine aktarılmaktadır (Eserkaya Güleç ve ark., 2010). Böylece dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi için yapılan uzun ıslah çalışmaları ile dayanıklılık kaynağının bulunduğu bitki çeşitleri belirlenerek üstün genotiplerin bulunduğu popülasyonlar elde edilmektedir (Dayteg ve ark., 2007).

Dayanıklılığın sağlanması için melezlemeyle elde edildikten sonra fenotipik seleksiyonla üstün genotipin belirlenmesine dayanan klasik ıslah yöntemleri zaman alıcı ve pahalıdır. Tüm bunların yanında her zaman kesin sonuç vermemesi klasik yöntemlere karşı caydırıcı bir nitelik kazandırmaktadır. Tam tersine istenen genotiplerin seçiminin DNA düzeyinde yapılmasının kısa sürede kesin sonuçlar vermesi ise araştırmacıları virüslere karşı moleküler markörlerle dayanıklılık yöntemlerini kullanmaya teşvik etmektedir. Genomun her noktasını temsil etme yeteneğine sahip olan DNA markörleri sonsuz sayıdadırlar. Genotipin belirlenmesi için kullanılan morfolojik ve biyokimyasal markörler çevresel faktörlerden oldukça etkilendikleri için moleküler markörlerin daha üstün olduğu söylenebilir (Yıldırım ve Kandemir, 2001). İşaret anlamına da gelen markörler, belirli bir organizmanın özelliklerinin genetiği hakkında bilgi sağlarlar. DNA'nın aktif bölgeleri olan genlerden ya da kodlama fonksiyonlarına sahip olmayan DNA dizilerinden geliştirilirler. Böylece aynı anda birden fazla dayanıklılık geninin belirlenmesini, genetik işlemlerinin her aşamasında dayanıklı ve duyarlı bitkileri birbirinden hızlı ve güvenli biçimde ayırma edilebilmesini sağlarlar (Devran, 2003). DNA markör haritalarının çıkarılabilir olması Moleküler Markör Seleksiyonu (MAS-Marker Assisted Selection) uygulamalarına temel oluşturmuştur. Böylece farklı biber hatlarındaki dayanıklılık genleri belirlenebilmekte ve tek bir hatta

aktarılarak dayanıklı nesiller üretilebilmektedir. Son yıllarda kullanımı oldukça yaygınlaşan MAS yardımıyla, yoğun talepler doğrultusunda biberlerde de aynı karaktere etki eden farklı genler tek bir hatta toplanarak viral hastalıklara karşı çoklu dayanıklılık elde edilebilmektedir (Şimşek, 2014). Gen piramidi de denilen bu yöntemle kalıcı dayanıklılığın sağlanması garanti edilebilmektedir (Eserkaya Güleç ve ark., 2010).

Bitkilerde virüslere karşı dayanıklılık tek genle kontrol ediliyorsa dikey dayanıklılık (kalitatif); birden çok genle kontrol ediliyorsa yatay (kantitatif) dayanıklılık olarak adlandırılır. Moleküler markörler kalitatif ve kantitatif genlerin haritalanmasına olanak sağlar. Tek genle kontrol edilen dayanıklılığın genetik analizi mendel kanunlarına dayanır ve alleller arasında kesin dominant ilişkiler bulunur. Fakat dominant ve resesif etkiler varsa ve birkaç gen tarafından kontrol ediliyorsa segregasyon oranları karmaşıklaşır dolayısıyla analiz ve kontrol de zorlaşır (İlbağı ve Çıtır, 2006). Bu bağlamda dayanıklı genlerle bağlantılı moleküler markörlerin belirlenmesi işleri kolaylaştırır. Birden çok genle kontrol edilen karmaşık kalıtıma sahip kantitatif karakterlerin ıslahında etkili olarak markörler kullanılır. DNA markör tekniklerinin bitki ıslahına uygulanmaya başlaması, istenen genler için çeşitler veya türler arasında aktarım hareketinin hızlanmasına, kantitatif özelliklerin (verim, kalite, kuraklık ve soğuk toleransı, hastalık ve zararlılara dayanıklılık) analiz edilmesine olanak sağlar (İşçi, 2008).

Polimeraz Zincir Tepkimesi (PCR-Polymerase Chain Reaction), in vitro koşullarda oligonükleotit primerler kullanılarak DNA polimeraz enzimi tarafından DNA'nın çoğaltılması için biyoteknoloji çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Kısa sürede az miktarda DNA baz dizisinden milyonlarca DNA parçacığı üretebilmektedir. Hızlı, güvenilir ve spesifik bir yöntem olması, kalıtsal hastalıkların teşhisi, genetik parmak izlerinin tanımlanması, bulaşıcı hastalıkların teşhisi, genlerin klonlanması, babalık testi, DNA hesaplaması, patojenlerin tespit ve teşhisi gibi birçok farklı alanda kullanılabilmesine olanak sağlar. 1985 yılında keşfedilen PCR tekniği ile dayanıklı bitkiler elde edebilmek amacıyla dayanıklılıktan sorumlu genlerin ve baz dizilimlerinin belirlenmesi, istenen genin aktarımı ilgili markör veya gene özgü primerler kullanılarak yapılabilmektedir. (Yılmaz ve Devran, 2003).

## 2.1 Tütün Mozaik Virüsü (TMV)

### 2.1.1 Belirtileri

Varlığı ilk olarak 1930'lu yıllarda belirlenen Tütün Mozaik Virüsü (TMV- Tobacco Mosaic Tobamovirus) biber yetiştiriciliğinde (*Capsicum annuum* L.) kalite bozulmalarına ve geniş çaplı ürün kayıplarına neden olan en önemli hastalıklardan biridir (Çelik ve ark., 2010). Hıyar Mozaik Virüsü ve Patates X Virüsü ile birlikte mozaik hastalığına neden olan virüslerden biri olan TMV, yapılan araştırmalarda test edilen yaprak örneklerinde PVY virüsüne oranla daha az bulunmaktadır (Bostan ve Dursun, 2002).

Hastalığın bulaştığı bitkinin genellikle bodur kaldığı ve boğum aralarının kısaldığı görülür. Belirtiler genellikle genç yapraklarda açık sarı ve yeşil mozaikler, sistemik nekrozlar ve saptan aşağı doğru kıvrılmalar şeklinde, meyvelerde ise koyu yeşil kabarıklıklar, çiçek ve meyvelerin dökülmesi şeklinde görülür. Hıyar, kavun, karpuz, kabak, muz, domates, biber, börülce ve mısır etmenin diğer konukçuları ve dolayısıyla hastalığın görüldüğü diğer bitkiler arasındadır (Tarım ve Köy İşleri, 2009).



Şekil 2.1. TMV belirtileri (Tarım Köy İşleri, 2009).

### 2.1.2 Yayılışı ve Mücadele Yöntemleri

Fiziksel temasla kolayca yayıldığı bilinen TMV'nin bulaşmasında rol oynayan bir böcek vektör belirlenememiştir. TMV'nin hasat sonrası atıklarda ve toprakta uzun süre kalabildiği, mekanik olarak ve yaprak bitleri ile taşındığı bilinmektedir. Bulaştığı bitkilerin kök ve yapraklarına zarar vermekte ve hasta ettiği bitkilerin sağlıklı bitkilere temasıyla kolayca taşınmaktadır. Bu nedenle fide şaşırtma döneminde sigara içen çiftçilerin bulaşık tütünlerle teması TMV'nin biberlere bulaşmasını kolaylaştırmış ve ardından diğer kültürel işlemlerle yayılmış olabileceği ihtimali bulunmaktadır (Bostan ve Dursun, 2002).

TMV en kararlı bitki virüslerinden biridir. Kuru bitki kalıntıları üzerinde, domates ve biber köklerinde bile uzun yıllar yaşamını sürdürebilir. Biber ve domates tohumları ile taşındığı da bilinmektedir. TMV'nin doğal yaşam alanı geniş olmasına rağmen birincil olarak Solanaceae familyası için sorun oluşturur (Zitter, 2005).

TMV'nin kontrol edilmesi bitki sağlığı için çok önemlidir. Özellikle bu, virüslerin daha çok tanılandığı seralar için geçerlidir. Bu nedenle kökleri de dahil olmak üzere tüm bitki materyalinin ve arazinin dezenfekte edilerek yeni ekime hazırlanması ve seranın virüsleri barındırmadığından emin olmak gerekir. Mücadele için alınan kültürel önlemlerin başında tarlanın yabancı otlardan ve bitki artıklarından temizlenmesi gelir. Ekim alanlarında şüpheli görülen bitkiler imha edilmelidir. Bitkilerin bakım işleri yapılırken eller bol sabunlu su ile yıkanmalıdır. Tohumla da taşındığı için satın alırken virüsten arı tohumlar olduğuna emin olarak alınması gerekir. Eğer tohumlar şüpheli kalitedeyse 30 dakika kadar %10'luk çamaşır suyu (household bleach) solüsyonunda ya da 15 dakika %10 trisodyum fosfat solüsyonunda (Na<sub>3</sub>P<sub>04</sub>) bekletilir. Bu tedbir tohumların yalnızca yüzeyindeki virüsleri temizler (Zitter, 2005). Serada veya tarlada tütün içeren maddeler içilmemeli ya da başka herhangi bir amaçla kullanılmamalıdır. Bir yıl biber, domates, hıyar, patlıcan, patates ekilirken ertesi yıl havuç, soğan, sarımsak, ıspanak, kereviz sonraki yıl bakla, bezelye, fasulye, sonraki yıl karnabahar, lahana, turp, marul, pırasa ekilerek ekim nöbeti uygulanması da kültürel önlemlerden biridir (Tarım ve Köy İşleri, 2009).

### 2.1.3 Dayanıklılık Mekanizması, Genleri ve Moleküler Markör Çalışmaları

Özellikle Solanaceae grubunda önemli verim ve kalite kayıplarına neden olan TMV, TMWV, PMMoV gibi biberde bütün tobamoviruslerin P0, P1, P1-2 ve P1-2-3 olmak üzere dört farklı prototipi belirlenmiştir (Çelik ve ark., 2013). L dayanıklılık geninin farklı allelleri kullanılarak yapılan farklı sınıflandırmalar sonucunda tobamovirüslere karşı L3 ve L4 allel genlerinin dayanım sağladığı belirlenmiştir. Bu genlerden L3; P0, P1, P1,2 ve L4; P0, P1, P1,2, P1,2,3 ırklarına dayanıklılık ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Şimşek, 2014).

TMV'ye karşı dayanıklı olan L4 ve L3 genleri ile ilgili yapılan çalışmalar sonunda belirlenen AFLP markörü, SCAR markörü gen aktarımlarında kullanılmaktadır. Ben Chaim ve ark., (2000) CMV virüsü için yaptıkları dayanıklılık çalışmalarında TMV ile ortak dayanıklılık geni olup olmadığını araştırmıştır. Lefebevre ve ark., (1995) çalışmasında önceden belirlediği cmw11.1 ile bağlantılı TG36'nın, TMV'ye dayanıklı L geni ile bağlantılı olduğunu belirlemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarda AFLP markörü E35/M48-101'in iyi derecede dayanıklılık gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

L4 alleli ile bağlantılı AFLP markörü SCAR markörüne çevrilerek (L4SC340) tobamovirüslere karşı dayanıklı çeşit geliştirmede hızlı ve etkili olduğu belirtilmiştir (Yang ve ark., 2009).

L4 alleleline yakın olan ve TMV virüsüne karşı dayanıklı olarak Matsunaga ve ark., (2003) WA31-1500S AFLP, SCAR, RAPD markörlerini; Yang ve ark., (2009) 060I2END dominant SCAR markörü ve 087H3T7 ko-dominant CAPS markörlerini kullanmışlardır.

Biberde L3 alleli için Sugita ve ark., (2004) PMFR11 ve PMFR21 SCAR markörlerini, Tomita ve ark., (2008) IH6- 06, IH6-04 ve 189D23M SCAR markörlerini, Yang ve ark., (2009) 060I2END dominant SCAR markörü ve 087H3T7 ko-dominant CAPS markörlerini tespit etmiştir (Yang ve ark., 2015).

## 2.2 Patates Y Virüsü (PVY)

### 2.2.1 Belirtileri

İlk olarak 1930'lu yıllarda teşhis edilen Patates Y Virüsü (Potato Virus Y- PVY), biberlerde en yaygın görülen virüslerden biridir. Türkiye'de özellikle Akdeniz Bölgesi örtüaltı biber üretim alanlarında önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır. Solanaceae familyasından patates, biber, domates ve tütün bitkilerinin yanında birçok farklı familyayı enfekte etmektedir. PVY'den dolayı % 100 ürün kayıplarının görüldüğü belirlenmiştir (Çelik, ve ark., 2013).

PVY, çok şiddetli enfeksiyonlarla bitkiyi öldürebilir. Biberlerde büyümede gerileme ve bodurlaşma olur, yumru bağlama azalır. İlk belirtiler, hasta yumrudan meydana gelen bitkide mozaik ve kıvrıkcıklaşma oluşumudur. Ardından yaprak alt damarları boyunca kahverengileşme ve kararma, yapraklarda hafif beneklenme, kıvrıkcıklaşma, damar nekrozu, düzensiz mozaik ve koyu lekeler görülür. Hastalığın ileri safhalarında tepe yapraklarında kıvrıkcıklaşma, kırçıl oluşumu, kolay kopmalar, dökülmeler ve alt yapraklarda nekrotikleşme ile gövdeye yapışma baskındır. PVY diğer virüslerden mozaikler, damar bantları ve yaprak nekrozları gibi oldukça değişken semptomlarla ayrılır (Caranta ve ark., 1999).



Şekil 2.2. Biber meyvelerinde PVY belirtileri (Çelik ve ark., 2012).

### 2.2.2 Yayılışı ve Mücadele Yöntemleri

PVY virüsü gibi biki virüsleri tek başına hareket etme yeteneğine sahip değildirler. Bunlar genellikle yaprak bitleriyle veya mekanik temasla taşınır. Mekanik temas, insan ya da rüzgar nedeniyle enfekte bitkinin sağlıklı bitkiye teması ile kısa mesafelerde bulaşır. Yapılan araştırmalarda büyük uzaklıklardaki bitkilerde bu virüsün görülmesi üzerine mekanik taşınmanın bu hızda yayılma için fazla yavaş olduğu düşünülmüştür ve ardından yaprak bitleri ile taşındığı tespit edilmiştir. PVY, 50'den fazla yaprak biti türüyle bütün dünyaya yayılmıştır. Yaprak biti, beslenirken aldığı virüsü sağlıklı bitkilere kalıcı olmadan bulaştırır. Genç bitkiler yaşlılara göre daha kolay hastalanır (Nolte ve ark., 2009).

PVY ile mücadele için başlangıçta alanın bulaşık bitkilerden arındırılması ve yakılması gerekir. Bunların yeni ürün üretiminde kullanılması yanlıştır. Temiz, sertifikalı ve aşılınmış bitkilerin kullanılması hastalığa dayanıklılığı artırır ve hasat anındaki kazancı artırır. Ayrıca arazideki mekanik bulaşmaları engellemek amacıyla kullanılan alet ve ekipmanların temizliğine dikkat edilmeli, hastalıklı olabilecek bitkilere temas edilirse sağlıklı bitkilere bulaşma ihtimaline karşı eller dezenfekte edilmelidir. Tek tük de olsa alanda görülen hasta bitkilerin yok edilmesi gerekir (USDA, 2011).

Hastalığı bulaştıran yaprak bitlerine karşı mücadele PVY virüsüne karşı mücadelesinin en önemli ayaklarından biridir. Yaprak bitlerinin beslenmesini önlemek için kullanılan kimyasallar yöntemlerden birisidir. Yaprak bitlerinin hareket özelliklerine göre tarlanın tasarımının ve bitkilerin tarla içindeki konumlarının da hastalığın yayılmasında etkili olduğu düşünülmektedir (USDA, 2011).

Dayanaklı bitkilerin kullanılması en etkili çözümlerden biridir. Bitkilerin dayanıklılığı hastalığı yapan virüsler için barınma, beslenme ve çoğalmayı engeller. Dolayısıyla hastalığın bulaşmasını ve virüsün çoğalmasını yavaşlatarak bitki kaybını azaltır (Caranta ve ark., 1999).

### 2.2.3 Dayanıklılık Mekanizması, Genleri ve Moleküler Markör Çalışmaları

Potyviriidae familyasının Potyvirus grubuna giren PVY'nin üç ayrı patotipi olduğu belirlenmiştir. PVY'nin bulunduğu konukçu bitkiye ve hastalık etmenine göre yapılan sınıflandırmaya göre bu ırklar PVY0, PVY1 ve PVY 1-2'dir. Türkiye'de ise PVY'nin 0 ve 1 patotiplerinin ağırlıklı olarak bulunduğu belirlenmiştir (Ekbiç ve ark., 1999). Patotip sınıflamasına göre yapılan çalışmalar sonucu pvr2 dayanıklılık sisteminin PVY0 ve PVY1'e ve TEV virüsüne (Tobacco Etch Virus) karşı etkili olduğu belirlenmiştir (Caranta ve ark., 1999).

Biberlerde potyviruslara karşı dayanıklılık gösterdiği belirlenen *pvr*'ler olarak adlandırılan 7 genden yalnızca Pvr4'ün PVY'nin tüm patotiplerine karşı dayanıklılık gösterdiği ve bu genin SCM 334 biber genitöründe bulunduğu belirlenmiştir (Kyle ve Palloix, 1997; Arnedo-Andrés ve ark., 2006).

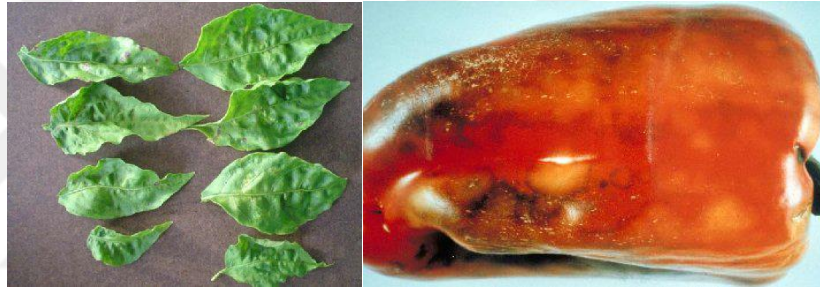
PVY'ye karşı dayanıklılık sağlayan Pvr4 geni ile ilgili yapılan çalışmalar sonunda bu genle bağlantılı olan AFLP markörü, SCAR markörü belirlenmiş ve gen aktarımlarında kullanılmaktadır. Ekbiç (1998), Bulk Segregant Analizi (BSA) ile PVY'ye karşı dayanıklılık geni belirlemek amacıyla yaptığı çalışmada Pvr4 genine ait bir RAPD markörü bulunmadığını belirlemiştir. Yine de SCM 334'ün sahip olduğu Pvr4 geninin PVY'ye karşı monogenik bir dayanıklılık sağladığını bulmaları da dayanıklılık ıslahında geri melezleme yöntemi ile bu dayanıklılığın aktarılabilceğinin tespitinde önemli bir adımdır.

Caranta ve ark., (1999), Pvr4 geniyle bağlantılı AFLP markörlerini belirleyerek kodominant CAPS markörüne, Arnedo-Andrés ve ark., (2002) Pvr4 ile bağlantılı RAPD markörünü belirleyerek SCAR markörüne çevirerek dayanıklılık ıslahında kullanmışlardır. Çelik ve ark., (2013) Pvr4 genine yakın olan kodominant CAPS moleküler işaretleyiciler kullanarak dayanıklı bitkileri belirlemişlerdir.

## 2.3 Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV)

### 2.3.1 Belirtileri

Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV-Tomato Spotted Wilt Virus), 1980'li yıllardan sonra ortaya çıkan, en fazla ekonomik kayba sebep olan ilk 10 virüs içinde 2. sıradadır. TSWV virüsü, domates, tütün, marul, biber, patates gibi birçok kültür bitkisini ve süs bitkilerini enfekte etmektedir (Şevik, 2015). Dünya çapında her yıl 1 milyar dolardan fazla kayba neden olduğu tahmin edilmektedir. Ülkemizde ilk olarak 1995 yılında, sera sebzeçiliğinin yapıldığı en önemli bölgelerden biri olan Kazanlı-Mersin'de domateslerde tespit edilmiştir (Güldür ve ark., 1995; Kamberoğlu, 2005).



Şekil 2.3. TSWV belirtileri (Tarım Köy İşleri, 2009).

TSWV enfeksiyonu sonucunda bitkilerde görülen genel belirtiler konukçu bitkinin türüne, çeşidine, yaşına, gelişme dönemine (fide, vejetatif, çiçeklenme, meyve dönemi vs.), virüsün ırkına, enfeksiyon zamanına ve iklim şartlarına (sıcaklık, ışık vs.) göre değişmektedir (Şevik, 2015). Genel olarak tüm bitkilerde bronzlaşma, kıvrılma, cüceleşme, nekrotik çizgiler ve benekler, yaprak sapı, gövde ve yeni gelişen sürgünlerde koyu kahverengi sürgünler, sürgün ucunda geriye doğru ölüm, bitkide tek yönlü bodurluk ve solgunluk, olgunlaşmamış meyvelerde yeşil, açık yeşil, kahverengi halka şeklinde belirtiler, olgun meyvelerde açık koyu sarı, kırmızı alanlar görülmektedir. Biberlerde ise olgun meyvede iç içe sarı halkalar, bodurluk, tüm bitkide genel sararma, yapraklarda klorotik düzensiz lekeler, mozaik, sürgün ucunda kurumalara bağlı olarak nekrotik çizgilerin meydana geldiği görülmektedir. Şiddetli enfeksiyonlarda virüs bitkiyi tamamen öldürebilmektedir (Turhan ve Korkmaz, 2006).

### 2.3.2 Yayılışı ve Mücadele Yöntemleri

TSWV'ye konukçuluk eden 69'a yakın bitki familyasından yaklaşık 1090 bitki türü bulunmaktadır. Bazı bitki tohumlarında, tohum kabuğunda ve düşük oranda taşındığı için TSWV'nin yayılmasında tohumla taşınma fazla önemli değildir. TSWV'nin genellikle mekanik yolla, tripslerle ve yabancı otlarla bulaştığı bilinmektedir (Turhan ve Korkmaz, 2006).

TSWV'ye konukçuluk eden bitki türünün geniş olması ve bunların içinde tek yıllık süs bitkilerinin, yabancı otların bulunması virüsün her mevsim yaşamasına olanak sağlar ve virüsle birlikte virüsü taşıyan trips vektörlerin yayılmasına neden olur (Kamberoğlu, 2005). Sekiz farklı trips türü ile yayılarak taşınan TSWV, ülkemizde sıklıkla *Frankliniella Occidentalis* ve *Thrips Tabaci* vektörleri ile özellikle Ege ve Akdeniz'de yayılmaktadır. Trips hasta bitkilerde 15-30 dakika beslenerek hastalığı kapar ve yaşamı boyunca taşır. Yine de virüs vektörün yumurtasına geçemez. Yoğun populasyonlarında bitkinin solunum ve fotosentez yapmasına engel olarak bitkinin zayıf kalmasına, verimin düşmesine neden olurlar (Eltez ve Karasavuran, 2006).

TSWV'nin mücadelesi için çok yönlü bir yöntem geliştirmek daha etkilidir. Çünkü tek bir yöntem yeterli gelmeyebilir. Kültürel yöntemler, tripslerle mücadele ve dayanıklılık çalışmaları ile birlikte daha kesin sonuçlar verir ve ekonomik kayıpların en aza düşürülmesini sağlar (Şevik, 2015).

Üretim alanının üretime başlamadan önce ve ekim süresince yabancı otlardan, süs bitkilerinden ve tripslerden temizlenmesi, TSWV ile mücadele için alınması gereken ilk kültürel önlemdir. TSWV'nin saptanmasında kullanılan serolojik yöntemler esnasında enzimle işaretlenmiş antibadiler, düşük maliyet, güvenilirlik, yüksek oranda duyarlılık gibi birçok avantaj sağlar. En çok kullanılan serolojik yöntemler ELISA ve immunoblot yöntemleridir. Son yıllarda immunoblot tekniği geliştirilerek elde edilen direkt doku emdirme yöntemi (Direct Tissue Blot Immunoassay=DTBIA) ile birçok virüs hastalığı ve mikoplazma benzeri hastalıklara karşı teşhiste başarı ile uygulanmaktadır (Turhan ve Korkmaz, 2006).

### 2.3.3 Dayanıklılık Mekanizması, Genleri ve Moleküler Markör Çalışmaları

Subtropik bölgelerde yaygın olan TSWV, Bunyaviridae familyası içindeki Tosopovirus cinsine dahil bir türdür (German ve ark., 1992, Gnayem, 1995). TSWV için domatesteste Sw-5 geni dayanım sağlarken (Oğuz ve ark., 2009), biberde Tsw geni dayanım sağlamaktadır.

Moury ve ark., (2000) çalışmalarında, Tsw lokusundaki tek bir dominant genle en az beş farklı C. Chinense hattına karşı TSWV'ye karşı hiperduyarlı dayanıklılık sağlandığını belirlemişlerdir. Belirlediği bu hatlardan (PI 15225, PI 159236, CNPH 275, C00943 ve 7204) türler arası melezlemeyle ürettiği popülasyonları kullanarak Tsw genine bağlı dört adet RAPD markörü tespit etmişlerdir. Sonradan kodominant SCAC568, CAPS markörüne çevrilen bu markör Tsw geninin geriye melezlemesinde ve MAS ile üstün çeşit ve hatlara aktarılmasında kullanılmaktadır.

Jahn ve ark., (2000) yaptıkları çalışmada, biberde dayanıklı gen olan Tsw ile domatesteki dayanıklı gen olan Sw-5'in genetik haritalarını RAPD ve RFLP markörlerini kullanarak karşılaştırmışlar ve bu genler arasındaki ilişkiyi açıklamışlardır.

Şimşek (2014) TMV ve TSWV'ye karşı çoklu virüs dayanıklılığı taşıyan yeni biber hatları geliştirmek amacıyla L3 geni için Tomita ve ark., (2008) tarafından belirlenen IH6-06, IH6-04 ve 189D23 SCAR markörleri, L4 geni için Yang ve ark., (2009) tarafından kullanılan 060I2END dominant SCAR markörü ve 087H3T7 kodominant CAPS markörü ve Tsw geni için Moury ve ark., (2000) tarafından geliştirilen SCAC568 kodominant CAPS markörlerini kullanmışlardır.



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmanın temel amacı Türkiye'de ve diğer dünya ülkelerinde en çok yetiştirilen, pazarlanan ve tüketilen bir ürün olan biberin sıklıkla karşılaşılan ve büyük ürün kayıplarına yol açan belirli virüslere karşı dayanıklılığını genetik olarak araştırmak ve katkıda bulunmaktır. Örnek çalışmalarda dayanıklılıkla ilişkili belirlenen markörler kullanılarak PVY, TMV, TSWV etmenlerine karşı çoklu dayanıklılık genleri içeren hatların ve çeşitlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla biberlerde verim kayıplarına neden olan ilk on virüs içinde yer alan TMV, PVY, TSWV virüslerinin yol açtığı hastalıklara karşı tohum firmalarına ait saf ve ileri biber hatları, dayanıklılık genlerine özgü markörlerle taranmıştır. Kullanılan materyal ve uygulanan yöntemler bu bölümde aktarılmaktadır.

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Bitkisel Materyal

Çalışmada LİDER Tohum Üretim ve Pazarlama Ltd. Şti ve AD-ROSSEN Tarım Sanayi ve Tic. AŞ.'den temin edilen saf ve ileri biber hatları kullanılmıştır. Firmaların bu hatları TMV, PVY ve TSWV viral hastalıklarına karşı genetik dayanıklılıklarının belirlenmesi için güncel literatürlerde adı geçen PCR-spesifik markörler yardımıyla taranmıştır.

Batı Akdeniz Araştırma Enstitüsünden (BATEM) temin edilen ve TMV, PVY ve TSWV virüslerine karşı dayanıklılığı bilinen hattan türetilmiş saf hatlar moleküler testlemelerde pozitif kontrol grupları olarak kullanılmıştır. Ayrıca, Amerikan Tarımsal Araştırma Servisi (Agricultural Research Service, ARS)'inden temin edilen hat ile merkezi Tayvanda bulunan AVRDC'den (Dünya Sebze Merkezi) temin edilen biber hattı, dayanıklılığın araştırılmasında kontrol grupları olarak kullanılmıştır.

### 3.1.2 DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için firma hatlarına ait yaprak örnekleri alınıp sıvı azotla muamele edildikten sonra kullanılıncaya kadar  $-(80)^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiştir. İzolasyon CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) yöntemi (Aldrich and Cullis, 1993) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

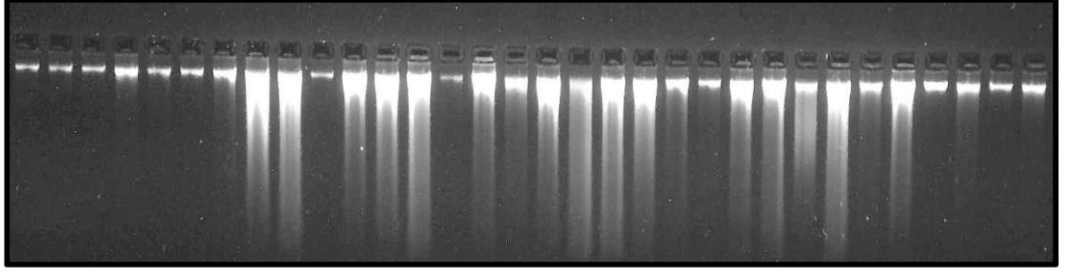
Taze yaprak dokusu Çizelge 3.1'e göre hazırlanan solüsyondan 700  $\mu\text{l}$  alınarak porselen havanlarda ezildikten sonra 1.5 ml'lik Eppendorf tüplere alınarak örnekler  $65^{\circ}\text{C}$ 'deki su banyosunda 2 saat bekletilmiştir. Bekleme süresince belirli aralıklarla örnekler su banyosundan alınıp kuvvetlice vortekslenmiştir. Su banyosundan alınan tüplerin üzerine 700  $\mu\text{l}$  chloroform: isoamylalcohol (24:1; v:v) ilave edilerek 5 dakika hafifçe alt üst edilerek karıştırılmıştır. Bu işlem sonrasında oluşan iki ayrı fazın altta kalan katı kısmına (pellet) protein ve diğer kalıntılar çökelerken, nükleik asitlerin bulunduğu üstteki faz mikro pipet yardımıyla yeni tüplere alınarak işlem bir kez daha aynı şekilde chloroform: isoamylalcohol (24:1; v:v) ile tekrar edilerek organik ayırım gerçekleştirilmiştir. Sonrasında oluşan ikinci üst faz da yeni tüplere alınmış ve üzerine hacimce  $2/3$ 'ü kadar  $-20^{\circ}\text{C}$  dolapta bekletilen soğuk isopropanol (2-propanol) eklenmiştir. DNA'nın çökmesi için tüpler  $-20^{\circ}\text{C}$  dolapta ortalama yarım saat kadar bekletildikten sonra 13 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek yıkama aşamasına geçilmiştir. Tüplerin alt kısmında çökelen DNA yıkama buffer'ı (%70'lik etanol + 7.5 mM amonyum asetat) ile iki kez yıkanmıştır. Kullanılan buffer içeriği Çizelge 3.1'de görülmektedir.

**Çizelge 3.1.** CTAB ekstraksiyon buffer içeriği.

Kimyasal Adı	Stok	100 ml için	Kalan konsantrasyonu
<b>NaCl</b>	1.4 M	8.18 gr	1.4 M
<b>EDTA (pH=8)</b>	0.5 M	4 ml	0.02 M
<b>TrisHCl (pH=8)</b>	1 M	10 ml	0.1 M
<b>CTAB</b>		2 gr	% 2
<b>2-Mercaptoethanol</b>		2 ml	% 2

Tüplerde kalan etanolün uzaklaştırılması amacıyla tüpler ağızları açık şekilde bir gece kurutulmaya bırakılmıştır. Kuruyan tüplere elde edilen DNA'nın miktarı göz önüne alınarak 50-100 µl TE (1X) buffer konularak, 65 °C'de 2-3 dakika bekletilip DNA çözünmesi sağlandıktan sonra uzun süreli saklamak amacıyla -20 °C'ye kaldırılmıştır.

DNA kalitesini ve konsantrasyonunu belirlemek için 4 µl'lik DNA örnekleri 2 µl yükleme boyasıyla (6x Loading Dye, Thermo Scientific, USA) parafilm üzerinde karıştırılarak % 1'lik agaroz jele yüklenmiş ve 100 V'da 1 saat yürütülmüştür. Etidyum bromid ile boyanan jelin UVP (Nuffield Road, Cambridge, UK) Gel-Doc®it 310 görüntüleme sistemiyle görüntülemesi yapılmıştır. Elde edilen jel görüntüsü Şekil 3.1'de görülmektedir.



**Şekil 3.1.** Ekstraksiyon sonrası DNA'ların jeldeki görüntüsü.

### 3.1.3 PCR Yöntemine Dayalı Analizler

#### 3.1.3.1 TMV hastalığına dayanıklılık analizleri

Proje ortağı firmaların elinde bulunan saf ve ileri hatlardan alınan yaprak örneklerinden elde edilen DNA'larda TMV'ye karşı dayanıklılık sağladığı bilinen genlerle ilişkili moleküler markör testlemelerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu genler, L3 geninde P0, P1, P1,2 ırkları; L4 geninde P0, P1, P1,2, P1,2,3 ırklarına dayanıklılık sağlamaktadır (Çelik ve ark. 2013). Moleküler testlemelerde L3 ve L4 genleri ile bağlantılı ve yakın olan TMV dayanımlarından L3 alleli için Sugita ve ark., (2004) tarafından belirlenen kodominant PMFR11 SCAR markörü ve L4 alleli için Yang ve ark., (2009) tarafından belirtilen 060I2END dominant SCAR markörü ve 087H3T7 kodominant CAPS markörü kullanılmıştır (Yang ve ark., 2015).

Dayanıklılık genleriyle ilişkili olduğu bilinen ve gen taramalarında kullanılan moleküler markörler, primerler, gösterdikleri band seviyeleri Çizelge 3.2'de verilmektedir.

**Çizelge 3.2.** Moleküler markörlerin dayanıklı ve hassas bireylerde verdiği band seviyeleri.

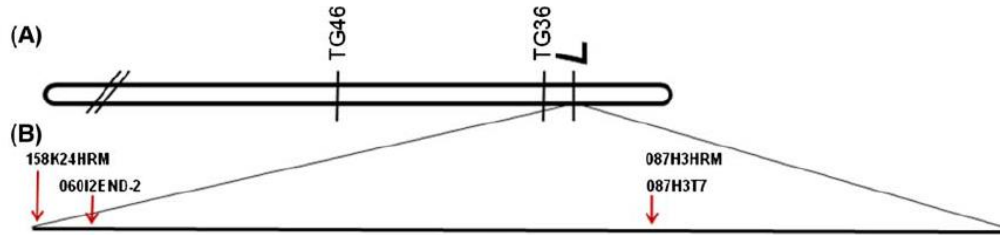
Gen	Moleküler Markör	PRİMER	Band Seviyeleri	Kesim enzimi	Literatür
L3	SCAR (codominant SCAR)	PMFR11	Dayanıklı bireyler 269bp'de hassas bireyler 283bp'de band vermiştir.		Sugita ve ark. 2004
L4	CAPS (codominant CAPS)	087H3T7	Dayanıklı bireyler 440bp'de, hassas bireyler 300bp'de bant vermiştir	Sspl	Yang ve ark. 2009
	SCAR (dominant SCAR)	060I2END	751 bp hassas		Yang ve ark. 2009

Çizelge 3.3'de çalışma kapsamında TMV araştırmaları için kullanılan PCR bazlı markörlerden Sugita ve ark. (2004) tarafından belirlenen PMFR11 SCAR markörünün ve Yang ve ark. (2009) tarafından belirlenen 087H3T7 ve 060I2END markörlerinin 5'-3' yönündeki gen dizilimleri verilmektedir.

**Çizelge 3.3.** Markörlere ait gen dizilimleri (Sugita ve ark., 2004; Yang ve ark., 2009).

PCR Spesifik Markör	DİZİLİM (5'-3')
PMFR11	F: CTGCAGAACAACAATGGCACG
	R: CTGCAGAACAACAATGGCACG
087H3T7	F: CCTTTGCCTGCATTATTCTTG
	R: GCCCAAATTTATTCCCAAATGC
060I2END	F: GCACATCAGCAGGTTTAGTACG
	R: CCAACTGTCAAACCTCGG TT

Biberin 11. kromozomu üzerinde bulunan 087H3T7 ve 060I2END markörlerinin L genine uzaklığı sırasıyla 1.2 cM ve 0.8 cM (centi Morgan) olarak bildirilmiştir. Markörlerin gen üzerindeki lokasyonları ise Şekil 3.2'de görülmektedir. Sugita ve ark. (2004) tarafından bildirilen PMFR11 SCAR markörü ise L3 genine 4.0 cM uzaklıktadır.

**Şekil 3.2.** 060I2END SCAR ve 087H3T7 CAPS markörlerinin lokasyonları (Yang et al. 2009).

Her bir hattın DNA'sı, moleküler testleme yapılacak dayanıklılık geni için aşağıdaki PCR protokolü kullanılarak elde edilmiştir. PCR optimizasyonunda tüm markörler için kullanılan buffer içeriği ve oranları Çizelge 3.4'te verilmektedir.

**Çizelge 3.4.** L3 ve L4 genleri için uygulanan PCR miksi.

İçerik	Miktar (µl)
H2O	6,7
10X PCR BUFFER with KC1	1,5
MgCl (2.5 mM)	1,5
dNTP (2.5 mM)	1,5
10 mM Primer (PF)	0,8
10 mM Primer (PR)	0,8
Taq DNA polymerase (5 u/ µl)	0,2
DNA	2
Mix	15

TMV'ye karşı dayanıklılık sağladığı bilinen L3 ve L4 genleriyle ilişkili kodominant SCAR ve CAPs markörlerinin optimizasyon işlemi elde edilen testlemelerde kullanılan PCR programı Çizelge 3.5'te verilmiştir.

**Çizelge 3.5.** PMFR11, 060I2END ve 087H3T7 markörleri için uygulanan PCR programları.

PMFR11	060I2END	087H3T7
95 °C 1 dk	94 °C 4 dk	94 °C'de 4 dk
34 döngü 94 °C 30 s	29 döngü 94 °C 30 s	30 döngü 94 °C'de 30 s
55 °C 20 s	63 °C 30 s	63 °C'de 30 s
72 °C 40 s	72 °C 30 s	72 °C'de 30 s
72 °C 7 dk	72 °C 10 dk	72 °C'de 10 dk
Hold 4 °C		

Markörlerle yapılan işlemlerde PCR ürünlerinin varlığını kontrol etmek ve belirlemek amacıyla agaroz jelde bir saat yürütülmüştür. PCR işlemi sonrası sspl kesim enzimi gerektiren L4 geni ile ilişkili CAPs markörü için ve aplikasyon ürünü olarak görülen örnekler için **sspl enzimi** ile kesim işlemi uygulanmıştır. Kesim protokolü aşağıda verildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Kesim protokolünde üretici firmanın yönergeleri izlenmiş ve Çizelge 3.6'daki buffer içeriği ve oranları kullanılmıştır. Kesme işlemi sonunda enzim eklenerek 65 °C'deki inkübatörde 16 saat bırakılarak yüksek sıcaklıkta oluşabilecek buharlaşmalara karşı tedbir olarak örneklerin üzeri parafilmle kaplanmıştır.

**Çizelge 3.6.** L4 markörü için uygulanan kesim protokolü.

İçerik	Miktar (µl)
H2O	17
1X Buffer R	2
Enzim (sspl enzimi)	1
PCR Ürünü	10

Uygulanan marköre göre kullanılan jellerin oranı ve türü şöyledir: PMFR11 primeri için %3'lük mikropore agaroz jel, 087H3T7 primeri için mikropore ile karıştırılmış %2'lik agaroz jel, 060I2END primeri için %2'lik agaroz jel kullanılmıştır. Ardından Etidyum bromid (EtBr) ile boyanan jeller UVP (Nuffield Road, Cambridge, UK) Gel-Doc®it 310 görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir.

### 3.1.3.2 PVY hastalığına dayanıklılık analizleri

Proje ortağı firmaların elinde bulunan saf ve ileri hatlardan alınan/gönderilen yaprak örneklerinden elde edilen DNA'larda PVY'ye karşı dayanıklılık sağladığı bilinen genlerle ilişkili moleküler markör testlemelerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Moleküler testlemelerde PVY'ye karşı dayanıklılık sağladığı bilinen Pvr4 geniyle ilişkili olduğu belirlenen kodominant CAPs markörü kullanılmıştır (Caranta ve ark., 1999).

Dayanıklılık genleriyle ilişkili olduğu bilinen ve gen taramalarında kullanılan moleküler markör, primer, gösterdikleri band seviyeleri kesim enzimleri ve literatür bilgisi Çizelge 3.7'de verilmektedir.

**Çizelge 3.7.** Moleküler markörlerin dayanıklı ve hassas bireylerde verdiği band seviyeleri.

GEN	Moleküler Markör	PRİMER	Band Seviyeleri	Kesim enzimi	Literatür
Pvr4	CAPs	CSO	444bp'de dayanıklı bireyler, 458bp'de hassas bireyler bant vermektedir.	AlwNI enzimi	Caranta ve ark., 1999

Çizelge 3.8'de çalışma kapsamında PVY araştırmaları için kullanılan PCR bazlı markörlerden Caranta ve ark., (1999) tarafından belirlenen CSO CAPs markörünün 5'-3' yönündeki gen dizilimi verilmektedir.

**Çizelge 3.8.** Markörlere ait gen dizilimleri (Caranta ve ark., 1999).

PCR Spesifik Markör	DİZİLİM (5'-3')
CSO (Caranta)	F: CGAAGAGAGAAGGTC
	R: TCAGGGTAGGTTATT

Caranta ve ark. (1999) biberdeki Pvr4 dayanıklılık geninde  $2.1 \pm 0.8$  cM ile  $13.8 \pm 2.9$  cM arasındaki bölgeyi AFLP markörleriyle tarayarak sekiz bağlantılı AFLP markörü belirlemiştir. Bunlardan en kullanışlı olduğu belirlenen  $2.1$  cM'de bulunan CSO markörü sonradan CAPS markörüne çevrilerek kullanılmıştır.

Çizelge 3.8'deki her bir hattın DNA'sı, moleküler testleme yapılacak dayanıklılık geni için aşağıdaki PCR protokolü kullanılarak elde edilmiştir. PCR optimizasyonunda tüm markörler için kullanılan buffer içeriği ve oranları Çizelge 3.9'da verilmektedir.

**Çizelge 3.9.** Pvr4 geni için uygulanan PCR miksi.

İçerik	Miktar (µl)
H2O	6,7
10X PCR BUFFER with KC1	1,5
MgCl (2.5 mM)	1,5
dNTP (2.5 mM)	1,5
10 mM Primer (PF)	0,8
10 mM Primer (PR)	0,8
Taq DNA polymerase (5 u/ µl)	0,2
DNA	2
Mix	15

PVY'ye karşı dayanıklılık sağladığı bilinen Pvy4 geniyle ilişkili CAPs markörlerinin optimizasyon işleminde elde edilen testlemelerde kullanılan PCR programı Çizelge 3.10'da verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** CSO markörleri için uygulanan PCR programları.

CSO	Modifiye Değerler
93 °C 1 dk	94 °C 3 dk
93 °C 45 saniye	94 °C 3 s
47 °C 1 dk	52 °C 30 s
72 °C 2 dk	72 °C 1 dk
Gt Tc 2 Rep 34	Gc tc2 rep 29
72 °C 5 dk	72 °C 10 dk
Hold 4 °C	Hold 4 End

Markörlerle yapılan işlemlerde PCR ürünlerinin varlığını kontrol etmek ve belirlemek amacıyla agragoz jelde bir saat yürütülmüştür. PCR işlemi sonrası AlwNI kesim enzimi gerektiren Pvr4 geni ile ilişkili markör için ve aplikasyon ürünü olarak görülen örnekler için **AlwNI enzimi** ile kesim işlemi uygulanmıştır. Kesim protokolü aşağıda verildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Kesim protokolünde üretici firmanın yönergeleri izlenmiş ve Çizelge 3.11'deki buffer içeriği ve oranları kullanılmıştır. Kesme işlemi sonunda enzim eklenerek 65

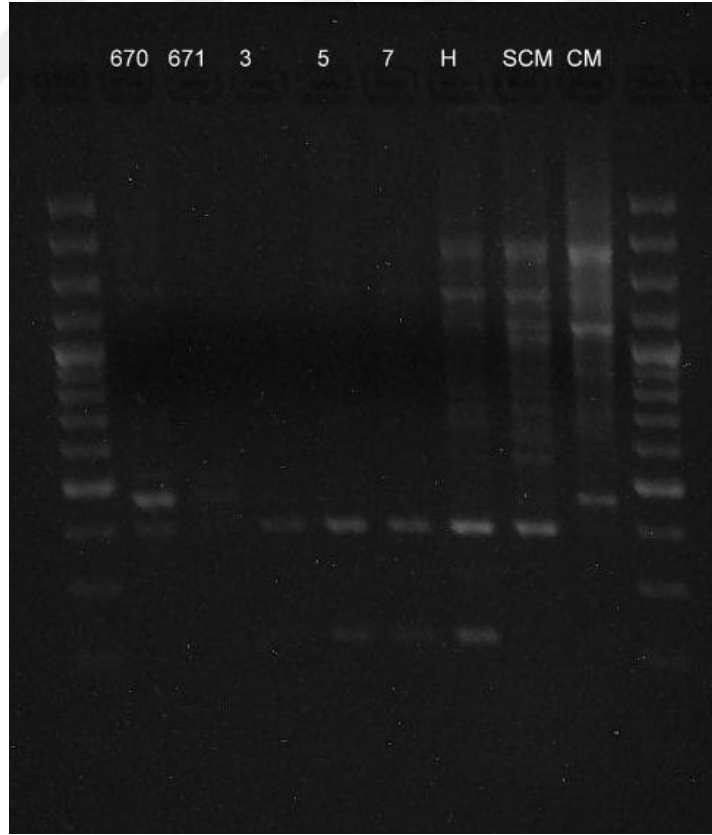
°C'deki inkübatörde 16 saat bırakılarak yüksek sıcaklıkta oluşabilecek buharlaşmalara karşı tedbir olarak örneklerin üzeri parafilmle kaplanmıştır.

**Çizelge 3.31.** CSO markörü için uygulanan kesim protokolü.

İçerik	Miktar (µl)
H <sub>2</sub> O	17
1X Buffer R	2
Enzim (AlwNI enzimi)	1
PCR Ürünü	10

PCR ürünleri % 3'lük Metaphor-agaroz jelde (Pronadisa, Conda Laboratuvarları, Madrid, İspanya) 100 V'da 3 saat yürütülmüştür. Etidyum bromid (EtBr) ile boyanan jellerin UVP (Nuffield Road, Cambridge, UK) Gel-Doc®it 310 görüntüleme sistemiyle görüntülemeleri yapılmıştır.

CSO geni bakımından taranan firma hatlarının jel görüntüsü Şekil 3.3'te görülmektedir.



**Şekil 3.3.** Pvr4 genine ait CSO jel görüntüleri. (D: Dayanıklı, H: Hassas, He: Heterozigot).

### 3.1.3.3 TSWV hastalığına dayanıklılık analizleri

Proje ortağı firmaların elinde bulunan saf ve ileri hatlardan alınan yaprak örneklerinden elde edilen DNA'larda TSWV'ye karşı dayanıklılık sağladığı bilinen Tsw geniyle ilişkili moleküler markör testlemelerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Moleküler testlemelerde Tsw geni ile bağlantılı ve yakın olan TSWV'ye karşı dayanıklılık sağlayan Moury ve ark., (2000) tarafından belirlenen SCAC568 kodominant CAPS markörü kullanılmıştır.

Dayanıklılık genleriyle ilişkili olduğu bilinen ve gen taramalarında kullanılan moleküler markör, primer, gösterdikleri band seviyeleri Çizelge 3.12'de verilmektedir.

**Çizelge 3.42.** Moleküler markörlerin dayanıklı ve hassas bireylerde verdiği band seviyeleri.

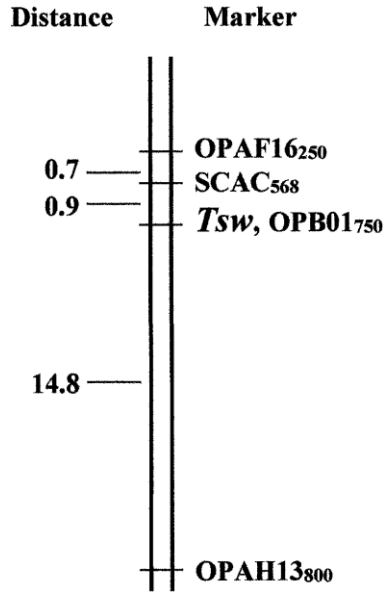
Gen	Moleküler Markör	PRİMER	Band Seviyeleri	Kesim enzimi	Literatür
Tsw	CAPS	SCAC 568 (codominant SCAR)	Dayanıklı bireyler 550bp, hassas bireyler 550, 350 ve 250bp band vermektedir.	Taq1 enzimi	Moury ve ark. 1999

Çizelge 3.13'te çalışma kapsamında TSWV araştırmaları için kullanılan PCR bazlı markörlerden Moury ve ark., (1999) tarafından belirlenen SCAC 568 CAPs markörünün 5'-3' yönündeki gen dizilimi verilmektedir.

**Çizelge 3.5.** Markörlere ait gen dizimleri (Moury ve ark., 2000).

PCR Spesifik Markör	DİZİLİM (5'-3')
SCAC 568	F: GTGCCAGAGGAGGATTTAT
	R: GCGAGGTGGACTGATACT

Moury ve ark., (1999) yaptıkları çalışmada MAPMAKER 0.3b programı yardımıyla SCAC56 markörünün Tsw lokusuna  $0.87 \pm 0.62$  cM uzaklıkta bulunduğunu hesaplanmış, yapılan taramalar sonucunda  $3.2 \pm 1.3$  cM'de olduğunu tespit etmişlerdir. Şekil 3.4 SCAC56 markörünün tahmini yerini temsil etmektedir.



**Şekil 3.4.** SCAC568 markörü (Moury ve ark., 2000).

Her bir hattın DNA'sı, moleküler testleme yapılacak dayanıklılık geni için aşağıdaki PCR protokolü kullanılarak elde edilmiştir. PCR optimizasyonunda tüm markörler için kullanılan buffer içeriği ve oranları Çizelge 3.14'de verilmektedir.

**Çizelge 3.4.** Tsw geni için uygulanan PCR miksi.

İçerik	Miktar (µl)
H2O	6,7
10X PCR BUFFER with KC1	1,5
MgCl (2.5 mM)	1,5
dNTP (2.5 mM)	1,5
10 mM Primer (PF)	0,8
10 mM Primer (PR)	0,8
Taq DNA polymerase (5 u/ µl)	0,2
DNA	2
Mix	15

TSWV'ye karşı dayanıklılık sağladığı bilinen Tsw geniyle ilişkili SCAC568 markörü optimize edilmiştir. Testlemelerde kullanılan PCR programı Çizelge 3.15'te verilmiştir.

**Çizelge 3.65.** SCAC568 markörü için uygulanan PCR protokolü.

<b>SCAC-568</b>
94 °C te 3 dk
35 döngü 94 °C for 30 s
56 °C'de 45 s
72 °C'de 75 s
72 °C'de 5 s
Hold 4 °C

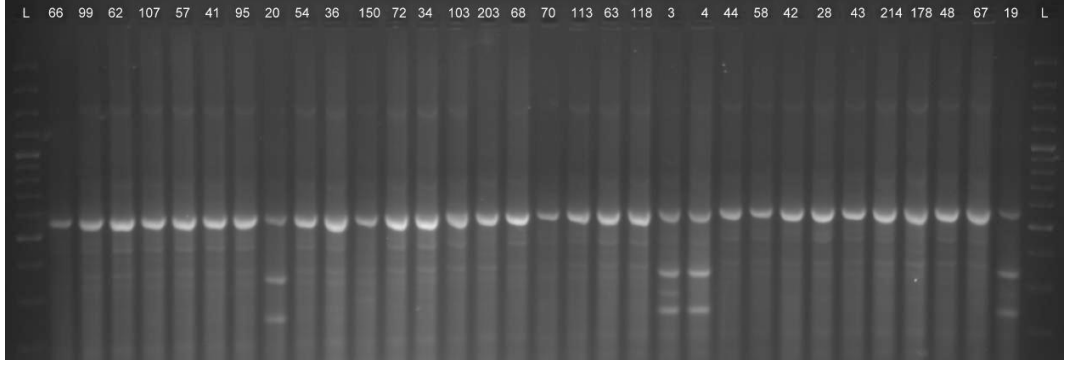
Markörlerle yapılan işlemlerde PCR ürünlerinin varlığını kontrol etmek ve belirlemek amacıyla agaroz jelde bir saat yürütülmüştür. Aplikasyon ürünü görülen örnekler **Taq1 enzimi** ile kesim işlemi uygulanmıştır. Kesim protokolünde üretici firmanın yönergeleri izlenmiş ve Çizelge 3.16'daki gibi buffer içeriği ve oranları kullanılmıştır. Kesme işlemi sonunda enzim eklenerek 65 °C'deki inkübatörde 16 saat bırakılarak yüksek sıcaklıkta oluşabilecek buharlaşmalara karşı tedbir olarak örneklerin üzeri parafilmle kaplanmıştır.

**Çizelge 3.76.** L4 markörü için uygulanan kesim protokolü.

<b>İçerik</b>	<b>Miktar (µl)</b>
H2O	17
1X Buffer R	2
Enzim (sspl enzimi)	1
PCR Ürünü	10

Bu optimizasyon için PCR ürünleri % 3'lük Metaphor-agaroz jelde 100 V'da 3 saat yürütülmüştür. Etidyum bromid (EtBr) ile boyanan jellerin UVP Gel-Doc®it 310 görüntüleme sistemiyle görüntülemeleri yapılmıştır.

Firma hatlarına ait DNA'ların TSWV'ye karşı dayanıklılık durumlarını gösteren jel örnekleri Şekil 3.5'de görülmektedir.



**Şekil 3.5.** TSWV TaqI Kesim Sonrası Jel Görüntüsü. (D: Dayanıklı, H: Hassas, He: Heterozigot).





## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

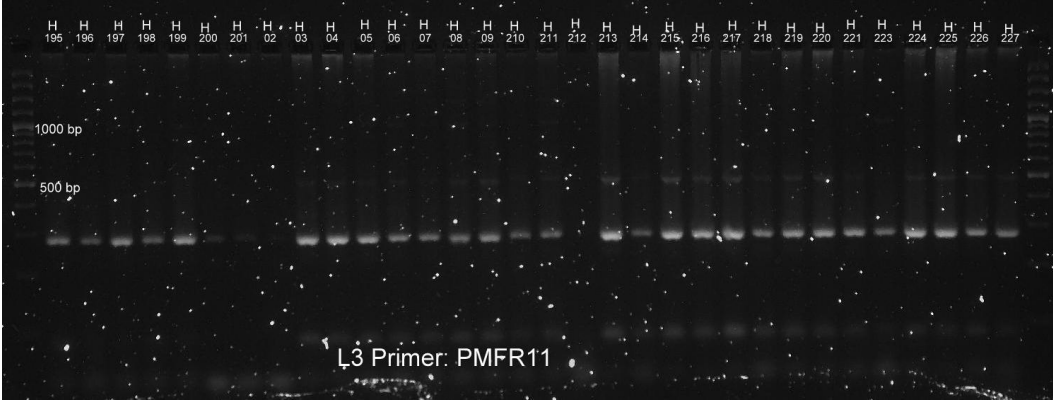
### 4.1 TMV Hastalığı Testlemeleri

TMV testlemeleri için L3 geniyle bağlantılı Sugita ve ark., (2004) tarafından belirlenen kodominant PMFR11 SCAR markörü ve L4 geniyle bağlantılı Yang ve ark., (2009) tarafından belirlenen 060I2END dominant SCAR markörü ve 087H3T7 kodominant CAPS markörlerinin optimizasyonu gerçekleştirildikten sonra firmaların agronomik yönden üstün performansa sahip hatları ve bu etmenlere dayanıklı oldukları bilinen USDA ve AVRDC'den temin edilen hatlar taşıdıkları genler bakımından bu markörlerle taranarak dayanıklılık durumları (homozigot/heterozigot) belirlenmiştir.

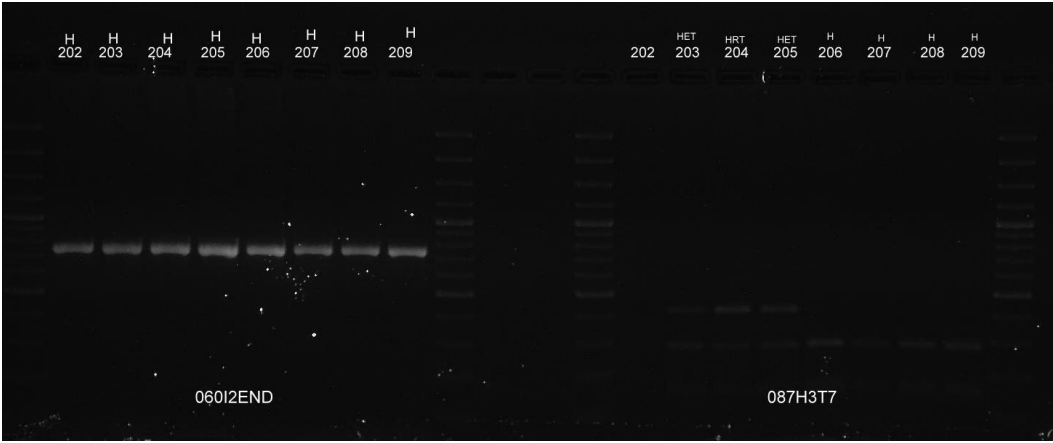
LİDER tohum ve AD-ROSSEN tohum firmalarından temin edilen saf ve ileri hatlar TMV'ye karşı dayanıklılık sağladığı bilinen L geni bakımından taranmıştır. Firmalardan gelen örnekler ve kontrol örnekleriyle PMFR11 SCAR markörü kullanılarak yapılan taramalarda dayanıklı bireyler 269bp'de hassas bireyler 283bp'de band vermiştir. 087H3T7 CAPS markörü ile yapılan taramalarda dayanıklı bireyler 440bp'de, hassas bireyler 300bp'de band vermiştir.

Testlemelerden alınan sonuçlar TMV ile ilgili dayanıklılık çalışmaları yapan Yung ve ark. (2009) tarafından L genine 1.2 cM uzaklıkta bulunan 087H3T7 codominant CAPS markörü ile 0.8 cM uzaklıkta bulunan 060I2END dominant SCAR markörüyle çalışmada belirtilen bp'de band veridiği görülmüştür. Benzer şekilde Sugita ve ark. (2004) tarafından belirlenen L4 genine 4.0 cM uzaklıkta bulunan codominant SCAR PMFR11 markörünün çalışmasında belirttiği gibi band veridiği görülmüştür.

Firma hatlarının TMV'ye karşı dayanıklılık durumları, PMFR11 SCAR markörü için Şekil 4.1'de, 060I2END dominant SCAR markörü ve 087H3T7 kodominant CAPS markörleri için Şekil 4.2'de görülmektedir.



**Şekil 4.1.** L3 geni ile ilişkili PMFR11 markörünün jel görüntüsü. (D: Dayanıklı, H: Hassas, He: Heterozigot).



**Şekil 4.2.** L4 geni ile ilişkili markörlerin jel görüntüsü. (D: Dayanıklı, H: Hassas, He: Heterozigot).

Firmaların geri melez ve kendilenmiş hatlarından toplam 57 hat testlemelere alınmış olup, TMV için firmalardan gelen biber hatları içinde 20'si heterozigot dayanıklı, 37'si hassas olarak belirlenmiştir. L3 geni bakımından test edilen 32 hat hassas olarak belirlenmiş, L4 geni bakımından ise test edilen 8 hattın 3'ü heterozigot dayanıklı, 5'i hassas olarak belirlenmiştir. Yapılan testlemeler sonucu elde edilen değerler Çizelge 4.1'de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Testlemeye alınan firma hatları ve TMV sonuçları.

TMV Testlemeleri				
	RR	Rr	rr	Toplam
<b>LİDER</b>	-	7	22	29
<b>AD-ROSSEN</b>	-	13	15	28
<b>Toplam</b>	0	20	37	57

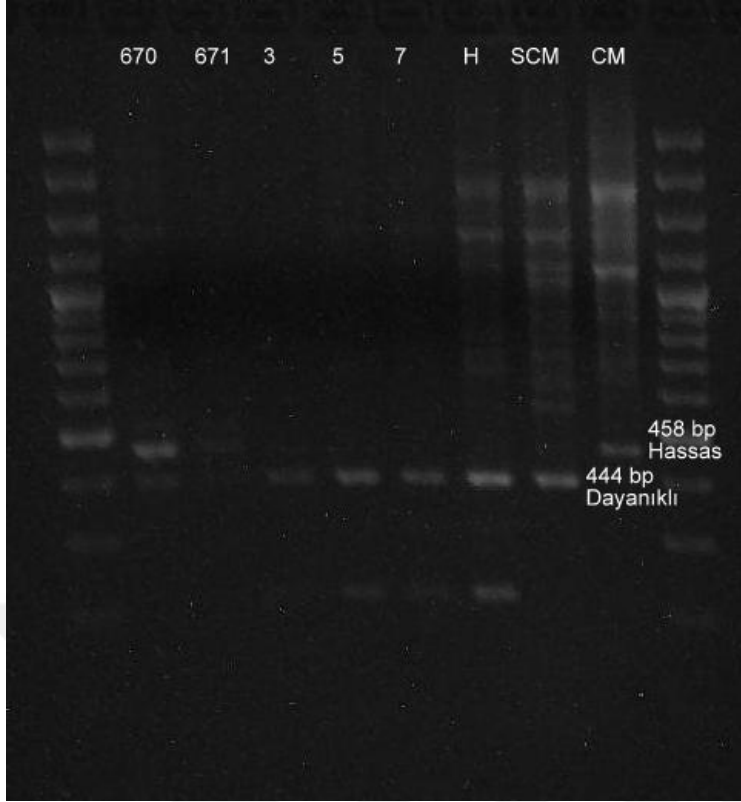
## 4.2 PVY Hastalığı Testlemeleri

Araştırma kapsamında PVY testlemeleri için Pvr4 geniyle bağlantılı Caranta ve ark., (1999) tarafından belirlenen CSO kodominant CAPS moleküler markörü ile optimizasyonu gerçekleştirildikten sonra firmaların agronomik yönden üstün performansa sahip hatları ve bu etmenlere dayanıklı oldukları bilinen USDA ve AVRDC'den getirilen hatların taşıdıkları genler bakımından bu markörlerle taranarak dayanıklılık durumları (homozigot/heterozigot) belirlenmiştir.

LİDER tohum ve AD-ROSSEN tohum firmalarından temin edilen saf ve ileri hatlar PVY'ye karşı dayanıklılık sağladığı bilinen Pvr4 geni bakımından taranmıştır. Firmalardan gelen örnekler ve kontrol örnekleriyle CSO CAPS markörü kullanılarak yapılan taramalarda dayanıklı bireylerin 444bp'de, hassas bireylerin 458bp'de band verdiği görülmüştür.

Testlemelerden alınan sonuçlar PVY ile ilgili dayanıklılık çalışmaları yapan Caranta ve ark. (2009) tarafından Pvr4 genine 1.2 cM uzaklıkta bulunan CSO kodominant CAPS markörüyle çalışmada belirtilen şekilde band verdiği görülmüştür.

Firma hatlarının PVY'ye karşı dayanıklılık durumları, CSO kodominant CAPS markörünün AluNI enzimiyle kesimi sonrası elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.3. Pvr4 genine ait CSO jel görüntüsü. (D: Dayanıklı, H: Hassas, He: Heterozigot).

Firmaların geri melez ve kendilenmiş hatlarından toplam 37 hat testlemelere alınmış olup, PVY için firmalardan gelen biber hatları içinde dayanıklı hat belirlenemezken, 37'si hassas olarak belirlenmiştir. Patates Y Virüsüne dayanıklılık bakımından her iki firmanın testlenen hatları arasında dayanıklı hat belirlenememiştir. Yapılan testlemeler sonucu elde edilen değerler Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Testlemeye alınan firma hatları ve PVY sonuçları.

PVY Testlemeleri				
	RR	Rr	rr	Toplam
<b>LİDER</b>	-	-	12	12
<b>AD-ROSSEN</b>	-	-	25	25
<b>Toplam</b>	0	0	37	37

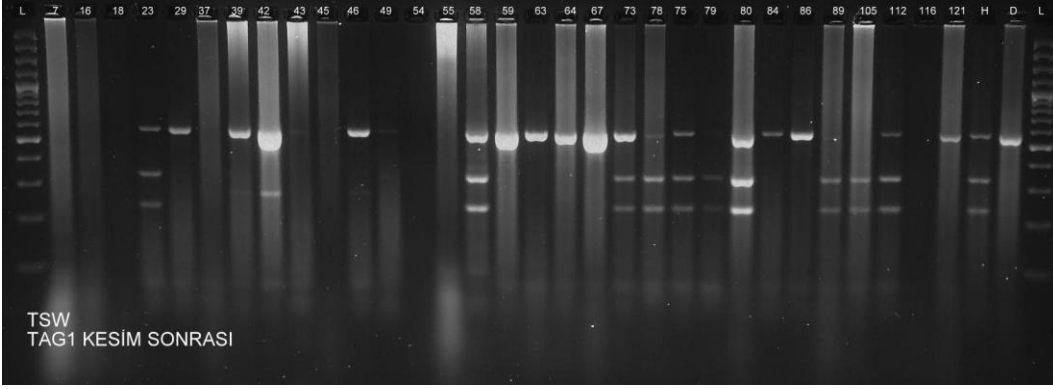
### 4.3 TSWV Hastalığı Testlemeleri

Araştırma kapsamında TSWV testlemeleri için Tsw geniyle bağlantılı Moury ve ark., (2000) tarafından belirlenen SCAC568 kodominant CAPS markörü ile testlenmiştir. TSWV'ye karşı dayanıklılık gösteren genlerle ilgili moleküler markörlerin optimizasyonu gerçekleştirildikten sonra firmaların agronomik yönden üstün performansa sahip hatları ve bu etmenlere dayanıklı oldukları bilinen USDA ve AVRDC'den getirilen hatların taşıdıkları genler bakımından bu markörlerle taranarak dayanıklılık durumları (homozigot/heterozigot) belirlenmiştir.

LİDER tohum ve AD-ROSSEN tohum firmalarından temin edilen saf ve ileri hatlar TSWV'ye karşı dayanıklılık sağladığı bilinen Tsw geni bakımından taranmıştır. Firmalardan gelen örnekler ve kontrol örnekleriyle SCAC568 markörü kullanılarak yapılan taramalarda dayanıklı bireylerin 550bp, hassas bireylerin 550, 350 ve 250bp band verdikleri görülmüştür.

Testlemelerden alınan sonuçlar TSWV ile ilgili dayanıklılık çalışmaları yapan Moury ve ark., (2000) tarafından tsw genine  $3.2 \pm 1.3$  cM uzaklıkta bulunduğu belirlenen SCAC568 kodominant CAPS markörü ile çalışmada belirtilen şekilde band veridiği görülmüştür.

SCAC568 kodominant CAPS markörünün TaqI enzimi ile kesimi sonrası elde edilen jel görüntüsünde firma hatlarının TSWV'ye karşı dayanıklılık durumları Şekil 4.4'de gösterilmektedir.



Şekil 4.4. TSWV Taq1 Jel Görüntüsü.

Toplamda 1864 biber hattının dayanıklı (homozigot veya heterozigot) ya da hassas karakterli olup olmadıkları belirlenmiştir. Yapılan taramalar sonucunda TSWV'e homozigot dayanıklı 877, heterozigot dayanıklı 517 hat tespit edilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Testlemeye alınan Firma hatları ve TSWV sonuçları.

TSWV Testlemeleri				
	RR	Rr	rr	Toplam
<b>LİDER</b>	444	414	371	1229
<b>AD-ROSSEN</b>	433	103	99	635
<b>Toplam</b>	877	517	470	1864

## 5. SONUÇ

SAN – TEZ projesinin bir parçası olan bu çalışmada, moleküler markör yardımcı seleksiyon tekniklerini kullanarak viral etmenlere karşı birden fazla dayanıklılık geni içeren (gen piramidi) biber hatları/çeşitlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda LİDER tohum ve AD-ROSSEN tohum firmalarından temin edilen saf ve ileri hatlar, TMV'ye karşı dayanıklılık sağladığı bilinen L3 ve L4 genleri bakımından, PVY'ye karşı dayanıklılık sağladığı bilinen Pvr4 geni bakımından ve TSWV'ye karşı dayanıklılık sağladığı bilinen Tsw geni bakımından taranmıştır.

TMV için firmalardan gelen biber hatlarından toplam 57 hat testlemelere alınmış olup, içinde 20'si heterozigot dayanıklı, 37'si hassas olarak belirlenmiştir. L3 geni bakımından test edilen 32 hat hassas olarak belirlenmiş, L4 geni bakımından ise test edilen 8 hattın 3'ü heterozigot dayanıklı, 5'i hassas olarak belirlenmiştir. PVY için firmalardan gelen biber hatlarından toplam 37 hat testlemelere alınmış olup, dayanıklı hat belirlenemezken, 37'si hassas olarak belirlenmiştir. TSWV için firmalardan gelen biber hatlarından toplam 1864 hat testlemelere alınmış olup, homozigot dayanıklı 877, heterozigot dayanıklı 517, hassas 470 hat tespit edilmiştir.

Firmalardan alınan biber hatlarının TMV, PVY ve TSWV'ye karşı dayanıklılık bakımından taşıdıkları gen durumları Çizelge 5.1'de gösterilmiştir.

**Çizelge 5.1. Firmalardan alınarak testlenen hat sayıları ve dayanıklılıkları.**

Patojen	Testlenen Hat Sayısı	Homozigot Dayanıklı (RR)	Heterozigot Dayanıklı (Rr)	Hassas (rr)
TMV	57	-	20	37
PVY	37	-	-	37
TSWV	1864	877	517	470

Tez ve proje kapsamında en az 3 dayanıklılık geni taşıyan hibrit çeşitlerin geliştirilmesi öngörülmüş ve bu, geliştirilen çeşitlerin TSWV'ye karşı dayanıklılık geni olan Tsw'yi bulundurmaları dolayısıyla başarıyla gerçekleştirilmiştir. Moleküler markör yardımcı seleksiyonla en az üç dayanıklılık genini taşıyan

hatların belirlenmesi ve başarı ölçütü olarak BC1F1 ve BC1F2 populasyonlarındaki bireylerin içerdikleri dayanıklılık genleri bakımından belirlenmesi ve bu genlerden en az üçünü içeren hatların elde edilmesi sağlanmıştır.

Her iki firmanın dayanıklı çeşitleri tescil edilmiştir. Lider Tohum Firmasının Cesur ve Kadim isimli çeşitleri, AD-Rossen Tohum Firmasının ise Heidi isimli çeşidi tescil edilmiştir. Firmalar tarafından proje süresince geliştirilen TSWV'ye karşı dayanıklılık geni taşıyan çeşitler ve özellikleri Çizelge 5.2'de gösterilmektedir.

**Çizelge 5.2.** Firmalar tarafından proje süresince geliştirilen TSWV'ye karşı dayanıklılık geni taşıyan çeşitler ve özellikleri.

Firma	Biber çeşidi	Özellikleri
LİDER TARIM AŞ.	Kadim	Açık saha Güzlük ve Baharlık Çarliston Biber
	Cesur	Örtü altı, sezonluk, Sivri Biber
	Şaheser	Örtü altı, sezonluk, çarliston biber
	Clio	Örtü altı, sezonluk ve baharlık. Kıl ile sivri biber arası bir segment.
AD-ROSSEN	Heidi	Kışık Demre Sivrisi biber
	Justine	Kışık Dolma biber
	Rihanna	Açık Saha Dolma biber
	Egeli	Açık Saha Dolma biber

Araştırma kapsamında yapılan moleküler markör yardımcı ıslah çalışmalarının sonunda elde edilen dayanıklı çeşitlerin üretilen bitki kayıplarının aza indirmesini sağlaması, üretimde daha çevreci bir yöntem olarak kimyasalların kullanımını azaltması, yabancı tohum şirketleriyle rekabet şansı yaratarak ulusal ekonomiye katkı sağlaması beklenmektedir. Daha geniş bir perspektifle firmaların Ar-Ge alt yapısına sağlanan katkı ile yerli hibritlerin geliştirilmesinin hız kazanması ve özellikle moleküler yardımcı seleksiyonun ıslah programlarında rutin hale gelerek gen piramitlemesi yöntemiyle birçok bitki için dayanıklı çeşitlerin hızlı ve güvenli bir şekilde üretilmesinin sağlanması; gelecek yıllarda daha sağlıklı beslenmeyi hayatımıza katması yönünde motive ederek ışık tutması umulmaktadır.

**KAYNAKLAR DİZİNİ**

- Akbay, C., Candemir, S., and Orhanksü, E., 2005,** "Türkiye’de Yaş Meyve ve Sebze Ürünleri Üretim ve Pazarlaması", Fen ve Mühendislik Dergisi, 8(2): 96p.
- Arnedo-Andres, M.S., Gil-Ortega, R., Luis-Artega, M., Hormaza, J. I., 2001,** “Development of RAPD and SCAR markers linked to the *Pvr4* locus for resistance to PVY in Pepper (*Capsicum annuum* L.)”,
- Ben Chaim, A., Grube, R, C., Lapidot, M., Jahn, M., Paran I., (2000)** Identification of quantitative trait loci associated with resistance to cucumber mosaic virus in *Capsicum annuum*. Theor Appl Genet (2001) 102:1213–1220pp.
- Caranta, C., A. Thabuis and A. Palloix,1999,** “Development of a CAPS marker for the *Pvr4* locus: A tool for pyramiding potyvirus resistance gene in pepper”, Genome 42: 11-1116pp.
- Devran, Z., 2003.,** "Moleküler İşaretleyicilerin (Markörlerin) Dayanıklık Islahında Kullanılması", Derim, 20:1-6.
- Duman, D.A., Zorlugenç, B. and Evliya B., 2002,** "Kahramanmaraş'ta Kırmızı Biberin Önemi ve Sorunları", KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi 5(1): 111p.
- Ekbic E., Abak K. and Yılmaz M.A., 1997,** “A New PVY Pathotype on Pepper Along Mediterranean Coastal Area of Turkey”, Proc.10th Cong, Medit. Phytopath. Union, Montpellier, 1-5 June 1997. 187-189pp.
- Eserkaya Güleç, T., Yıldırım, A., Ateş Sönmezoğlu, Ö., 2010,** "Bitkilerde Markör Destekli Seleksiyon", Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 3(2): 67-79ss.

- German, T.L., Ullman, D.E. and Moyer, J.W., 1992**, "Tospoviruses: Diagnosis, Molecular Biology, Phylogeny and Vector Relationships", *Ann. Rev. Phytopathol.* 30: 315- 348 pp.
- Gnayem, N., 1995**, "Epidemiological and Biological Aspects of Tomato Spotted Wilt Virus-TSWV", M. Sc. Thesis Submitted to the Faculty of Agriculture of Hebrew University of Jerusalem, Rehavot, Israel.
- Hartl, D. L., 1994**, "Genetics", Third Edition, Jones and Bartlett Publishers Int., London.
- İşçi, B., 2008**, "Asmada QTL (Kantitatif Karakter Lokus) Analizi", *ANADOLU, J. of AARI*,18 (2) 2008, 11 – 37pp.
- Kahya, S., Buyukcangazı E., And Carlı, T., 2013**, "Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Optimizasyonu" *Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med.* 32 (2013), 1: 31-38 pp.
- Kılıç, H.C., Yardımcı, N., Toplu, S., and Konu, A., 2015**, "Cucumber Mosaic Virus and Pepper Mild Mottle Virus in Pepper Growing Areas in Burdur Province, Turkey", *International Journal of Scientific and Technological Research*, Vol 1, No.1: 50-60pp.
- Kumar Basu, S. and Krishna De, A., 2003**, "Capsicum: Historical and Botanical Perspectives", edit by Amit Krishna De, *Capiscum*, London, First published 2003.
- Kyle, M.M., and Palloix, A. 1997**, "Proposed Revision of Nomenclature for Potyvirus Resistance Genes in Capsicum", *Euphytica*, 88: 231–239pp.
- Maltaş, E., 2011**, "Ginkgo biloba'nın Kimyasal Ve Moleküler Yötemlerle Analizi", Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Konya,1-204pp.

- Moury, B., Pflieger, S., Blattes, A., Lefebvre, V., Palloix, A., 1999,** “A CAPS Marker to Asist Selection of Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) Resistance in Pepper”,
- Nolte, P., Alvarez, J.M., and Whitworth, J.L., 2009,** “Potato Virus Y Management fort he Seed Potato Producer”, University of Idaho Extension, CIS 1165.
- Özalp, R., 2010.,** “Ülkemizde Biber Üretimi ve Örtüaltı Biber Yetiştiriciliği”, Tarım Türk Dergisi, Temmuz-Ağustos 2010, Sayı:24, Yıl:5, (S: 29-32).
- Simson, M.G., 2006,** "Plant Systematics", Elsevier Academic Pres. Kaliforniya.
- Sugita, T., K. Yamaguchi, Y. Sugimura, R. Nagataa, K. Yuji, T.Kinoshita and A. Todoroki., 2004,** Development of SCAR Markers linked to *L<sup>3</sup> gene in Capsicum*. Breed. Sci. 54: 111-115 pp.
- Şevik, M.A., 2015,** "Sebze Üretimini Tehdit Eden Viral Hastalık Etmeni: Domates lekeli solgunluk virüsü (Tomato spotted wilt virus – TSWV)", Derleme Makalesi / Review Article, Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der. / Iğdır Univ. J. Inst. Sci. & Tech. 5(2): 17-23 pp.
- Şimşek, D., 2014,** “Moleküler Islah Yöntemleri Kullanılarak Tospovirus ve Tobamoviruslere Dayanıklı Çarlı Biber (*Capsicum Annum L.*) Hat ve Çeşitlerinin Geliştirilmesi”, Selçuk Tar Bil Der, 1(1):1-5pp.
- TUIK.,** [http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb\\_id=45&ust\\_id=13](http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb_id=45&ust_id=13), (Erişim Tarihi: 1 Mayıs 2016).
- Turhan, P. and Korkmaz, S., 2006,** "Çanakkale İlinde Domates Lekeli Solgunluk Virüsünün Serolojik ve Biyolojik Yöntemlerle Saptanması", Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi, 12 (2): 130-136 pp.

**USDA, 2011,** "Information on PVY", <http://www.potatovirus.com/index.cfm/page/pvyinfo.htm>, (Erişim Tarihi: 1 Mayıs 2016).

**Yaldız, G., 2008,** "Farklı Süs Biberi (Capsicum Sp.) Tür ve Hatlarında Verim ve Kalite Özellikleri ile Optimal Kurutma Yöntem ve Parametrelerinin Saptanması", Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Adana.

**Yang, H. B., Liu, W.Y., Kang, W. H., Jahn, M.J. and Kang, B. C., 2009,** "Development of SNP Markers Linked to the L Locus in Capsicum Spp. by a Comparative Genetic Analysis", In Current Technologies in Plant Molecular Breeding, Springer Netherlands. 24:433-446pp.

**Yang, H. B., Kang, W. H., Nahm, S. H., & Kang, B. C. , 2015,** "Methods for Developing Molecular Markers", In Current Technologies in Plant Molecular Breeding, Springer Netherlands. (pp. 15-50).

**Yılmaz, S. and Devran, Z., 2003,** "Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Ve Bitki Biyoteknolojisinde Yaygın Uygulamaları." Derim 20.1 (2003): 31-42pp.

**Zitter, T.A., 2005,** "Pepper Disease Control - It Starts with the Seed", [http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/NewsArticles/PepDisease\\_Con.html](http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/NewsArticles/PepDisease_Con.html), (Erişim Tarihi: 1 Mayıs 2016).

## ÖZGEÇMİŞ

Duygu Özdemir 1987 yılında Antalya Demre ilçesinde dünyaya geldi. İlköğretim ve liseyi Antalya’da tamamladı. 2006 yılında Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi’nde lisans eğitimi aldı. Mezun olduktan sonra 2010 yılında yüksek lisans eğitimine başladı. 2013 yılında Bircan Tohum Şirketi’nde Islah asistanı olarak işe başladı. 2015 yılından itibaren Axia Tohum Şirketi’nde çalışmaktadır.

