



T.C.  
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE'DE BİBERLERDE *Tütün yanıklık virüsü (Tobacco etch virus, TEV)*' nün GENETİK KARAKTERİZASYONU ve *pvr* ALELLERİ İLE İLİŞKİSİ**

**AYŞE GÜL YILDIZ**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KAHRAMANMARAŞ 2016**

T.C.  
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**TÜRKİYE'DE BİBERLERDE *Tütün yanıklık virüsü (Tobacco etch virus, TEV)*' nün GENETİK KARAKTERİZASYONU ve *pvr* ALELLERİ İLE İLİŞKİSİ**

**AYŞE GÜL YILDIZ**

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

**KAHRAMANMARAŞ**

**2016**

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Ayşe Gül YILDIZ tarafından hazırlanan “Türkiye’de Biberlerde *Tütün yanıklık virüsü (Tobacco etch virus, TEV)*’nün Genetik Karakterizasyonu ve *pvr* Alelleri ile İlişkisi” adlı bu tez, jürimiz tarafından 09/08/ 2016 tarihinde oy birliği / oy çokluğu ile Bitki Koruma Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nihal BUZKAN .....

Bitki Koruma Anabilim Dalı,

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Mustafa KÜSEK (ÜYE) .....

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU (ÜYE) .....

Bitki Koruma Anabilim Dalı,

Çukurova Üniversitesi

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Mustafa ŞEKKELİ .....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## TEZ BİLDİRİMİ

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

Ayşe Gül YILDIZ

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

Proje No: 2015/1-7YLS

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

# TÜRKİYE'DE BİBERLERDE *Tütün yanıklık virüsü (Tobacco etch virus, TEV)*' nün GENETİK KARAKTERİZASYONU ve *pvr* ALELLERİ İLE İLİŞKİSİ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Ayşe Gül YILDIZ

## ÖZET

Bu tez çalışması, Türkiye'de biber yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı Adıyaman, Hatay, Kahramanmaraş, Kilis, Mersin ve Şanlıurfa illerinde Tütün yanıklık virüsü (TEV)'nün yaygınlığının belirlenmesi, izolatlarının genetik çeşitliliğinin ve *pvr* allellerinin incelenmesi amacıyla yürütülmüştür.

Araştırma kapsamında virüs-benzeri semptom taşıyan 561 biber bitkisinden yaprak ve meyve örneği alınarak değerlendirilmiştir. Bitki örnekleri TEV spesifik poliklonal antiserum kullanılarak DAS-ELISA testi ile testlenmiş ve TEV saptanan örneklerin virüs kılıf proteini kodlayan bölgesini çoğaltmak için RT-PCR kullanılmıştır. ELISA testi ile toplam örneklerin % 12,8'inde TEV enfeksiyonu belirlenmiştir. TEV'in en fazla yaygın olduğu il % 18,7 (55/294) ile Hatay olurken, en az TEV enfeksiyonuna % 3,38 (2/59) Şanlıurfa ilinde rastlanmıştır. Hatay izolatlarının (5adet) kılıf protein bölgesi nükleotid dizinlerinin filogenetik analizine göre beş izolat dışında tüm izolatlar kendi aralarında alındıkları yıllara göre üç farklı grupta toplanmıştır. Bu izolatlar gen bankasında kayıtlı Çin izolatlarıyla benzer nükleotidi dizilişine sahiptir.

**Anahtar Kelimeler:** *Capsicum annuum*, TEV, patotip, genetik dayanıklılık, *Potyvirus*

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Bitki Koruma Anabilim Dalı, Ağustos/ 2016

Danışman: Prof. Dr. Nihal BUZKAN

Sayfa sayısı: 33

# GENETIC CHARACTERIZATION OF *Tobacco etch virus* (TEV) AND INTERACTION TO *pvr* ALLELES

(M.Sc. THESIS)

Ayşe Gül YILDIZ

## ABSTRACT

This study was carried out in Adiyaman, Hatay, Kahramanmaraş, Kilis, Mersin and Sanliurfa locations, most pepper growing areas to determine the prevalence of *Tobacco etch virus* (TEV), genetic diversity of isolates and to evaluate the interaction to *pvr* resistance alleles. Total of 561 fruit and leaf samples from plants carrying virus-like symptoms were evaluated during research. Samples were tested in DAS-ELISA using TEV specific polyclonal antiserum, then positive-resulting ones were subjected to RT-PCR to amplify coat protein genome. About 12,8% of tested samples were found to be infected positive for TEV in ELISA test. The highest number of samples were from Hatay (18,7%) and the least was from Sanliurfa (3,38%).

Most isolates from Hatay except five created three distinct group according to their phylogenetic analysis of coat protein genome. They had high nucleotide identity with Chinese isolate in Gene Bank.

**Key Words:** *Capsicum annuum*, TEV, pathotype, genetic resistance, *Potyvirus*

Kahramanmaraş Sütçü İmam University  
Institute for Graduate Studies in Science and Technology  
Department of Plant Protection, August/ 2016

Supervisor: Prof.Dr. Nihal BUZKAN

Page number: 33

## TEŞEKKÜR

Bana bu araştırma konusunu veren Y¼ksek Lisans programı s¼resince yardımlarını esirgemeyen, alışmalarım esnasında her konuda desteğini aldığım, her t¼rl¼ özveriye bana sağlayan, saygıdeğer danışmanım Sayın Prof. Dr. Nihal BUZKAN'a teőekk¼rlerimi sunarım.

Survey alışmaları, laboratuvar testleri ve gereken birçok konuda desteklerini esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Bekir B¼lent ARPACI'ya, çok teőekk¼r ederim.

¼ęrenim hayatım boyunca bana sevgi ve her t¼rl¼ desteklerini sunan çok değerli ve çok sevgili aileme ¼zellikle teőekk¼r ederim.

**Ayşe G¼l YILDIZ**

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET .....	I
ABSTRACT .....	II
TEŞEKKÜR .....	III
İÇİNDEKİLER .....	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	IX
1.GİRİŞ .....	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	4
2.1.Türkiye’deki Çalışmalar .....	5
3.MATERYAL VE METOT .....	8
3.1.Materyal .....	8
Şekil 3.1. Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde survey yapılan iller	8
3.2.Metot .....	8
3.2.2. Serolojik Test .....	9
3.2.2.2. Toplam Nükleik Asit (TNA) İzolasyonu .....	10
3.2.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyon (Polymerase Chain Reaction, PCR) .....	11
3.2.2.5. PCR DNA’larının Elektroforetik Analizi .....	12
3.2.2.6. Nükleik Asit Dizi Analizi .....	12
3.2.3.İzolatların <i>pvr</i> Alleleriyle İlişkinin Belirlenmesi .....	12
4.BULGULAR VE TARTIŞMA .....	14
4.1.Simptomatolojik Gözlemler .....	14
Şekil 4.4. Yapraklarda mozaik ve sararma	15
4.2. Serolojik Testler .....	16
4.2.1. DAS-ELISA ile Biber Örneklerinde TEV Tanılanması .....	16
4.3. TEV’nün Filogenetik Analizi .....	18
5.SONUÇ VE ÖNERİLER .....	23
6.TARTIŞMA .....	24
7. KAYNAKLAR .....	25
EKLER .....	30
ÖZGEÇMİŞ .....	32

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AMV:</b>	<i>Arabis mosaic virus</i>
<b>bç:</b>	Baz çifti
<b>BWYV:</b>	<i>Beet western yellow virus</i>
<b>CABYV:</b>	<i>Cucurbit aphit-borne yellow virüs</i>
<b>CMV:</b>	<i>Cucumber mosaic virus</i>
<b>cDNA:</b>	Complementary DNA
<b>D:</b>	Dayanıklı
<b>da:</b>	Dekar
<b>DAS:</b>	Double Antibody Sandwich
<b>DIECA:</b>	Diethyldithiocarbamic acid
<b>DNA:</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>dNTP:</b>	Deoxynükleotid
<b>Du:</b>	Duyarlı
<b>eLF4E:</b>	Ökaryotik Translasyon Başlangıç Faktörü 4E
<b>ELISA:</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>FAO:</b>	Uluslararası Gıda ve Tarım Örgütü
<b>ha :</b>	Hektar
<b>KP:</b>	Kılıf Protein
<b>Kb:</b>	Kilobaz
<b>µl:</b>	Mikrolitre
<b>mg:</b>	Miligram
<b>ml:</b>	Mililitre
<b>mM:</b>	Milimolar
<b>M-MLV:</b>	Maloney Murine Leukemia Virus
<b>NCBI:</b>	The National Center for Biotechnology Information
<b>nm:</b>	Nanometre
<b>O.D. :</b>	Optical Density

<b>PCR:</b>	Polymerase chain reaction
<b>PepMMoV:</b>	<i>Pepper mild mottle virus</i>
<b>PLRV:</b>	<i>Patato leafroll virus</i>
<b>PMMoV:</b>	Biber Hafif Benek Virüsü
<b>PVA:</b>	<i>Potato virus A</i>
<b>PVBV:</b>	<i>Pepper vein banding virus</i>
<b>PVM:</b>	<i>Potato virus M</i>
<b>PVY:</b>	<i>Potato virus Y</i>
<b>PVX:</b>	<i>Potato virus X</i>
<b>RFLP:</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RNA:</b>	Ribonükleikasit
<b>TEV:</b>	<i>Tobacco etch virus</i>
<b>TMV:</b>	<i>Tobacco mosaic virus</i>
<b>TNA:</b>	Toplam nükleik asit
<b>ToMV:</b>	<i>Tomato mosaic virus</i>
<b>TSWV:</b>	<i>Tomato spotted wilt virus</i>
<b>TÜİK:</b>	Türkiye İstatistik Kurumu
<b>U:</b>	Ünite
<b>UV:</b>	Ultraviole
<b>VPg:</b>	Protein gen

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 3.1.	Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde survey yapılan iller.....	7
Şekil 4.1.	Yapraklarda mozaik.....	12
Şekil 4.2.	Yapraklarda damar aralarında renk açılması.....	13
Şekil 4.3.	Yapraklarda yukarı kıvrılma ve sararma.....	13
Şekil 4.4.	Yapraklarda mozaik sararma.....	14
Şekil 4.2.	DAS-ELISA Testinde TEV tanılanmış örneklerde kolorimetrik analiz sonucu.....	15
Şekil 4.3.	Biber yaprak ve meyvelerinden izole edilen TNA'lardan hazırlanan cDNA'ların PCR DNA'larının elektroforetik analizi. Marker (M): 100 bç DNA Standartı (Fermentas).....	17
Şekil 4.4.	Biber yaprak ve meyvelerinden izole edilen TNA'lardan hazırlanan cDNA'ların PCR DNA'larının elektroforetik analizi. Marker (M): 100 bç DNA Standartı (Fermentas).....	17
Şekil 4.5.	Biber yaprak ve meyvelerinden izole edilen TNA'lardan hazırlanan cDNA'ların PCR DNA'larının elektroforetik analizi. Marker (M): 100 bç DNA Standartı (Fermentas).....	18
Şekil 4.6.	Hatay Bölgesi'nde biber alanlarından tanılanan TEV-KP izolatları ile gen bankasına kayıtlı benzer izolatlarından dizilerinin “Neighbor-joining” yöntemine göre karşılaştırmalı olarak hazırlanmış filogenetik ağacı.....	19

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa No

Çizelge 3.2.	TEV- KP bölgelerinden hazırlanan PCR primerleri.....	11
Çizelge 4.1.	Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde survey yapılan alanlar ve örnek sayıları.....	14
Çizelge 4.2.	DAS-ELISA testinde lokasyonlara göre TEV'nün yaygınlık durumu.....	15
Çizelge 5.1.	<i>pvr</i> alellerinin TEV izolatlarına karşı gösterdiği reaksiyonlar.....	21



## 1.GİRİŞ

Biber (*Capsicum annuum* L.) bitkisinin, insan beslenmesinde yaklaşık 7 bin yıldır kullanıldığı, yetiştiriciliğinin ise 5 bin yıldan beri yapıldığı birçok yayında rapor edilmiştir (Heiser, 1973).

*Solanaceae* familyasına dahil olan *Capsicum* cinsi içerisinde yaklaşık 30 türden bahsedilmektedir. Bunlardan, *Capsicum annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* L., *C. frutescens* L., ve *C. pubescens* L. olmak üzere 5 tür kültüre alınmıştır (Pickersgill, 1997).

Gıda işleme sanayinde ticari olarak kullanılan birçok biber ürünü, *C. annuum* L. türünün meyvelerinden elde edilir. Birçok biber çeşidi, taze veya pişirilmiş olarak tüketilebilen, sos, turşu, salça, kurutularak baharat yapımında ve oleoresin imalatında hammadde olarak kullanılabilen meyveleri için yetiştirilir.

Türkiye toplam 1.480.000 ton biber üretimiyle, Akdeniz havzasında bulunan diğer ülkeler içerisinde en önemli üretici durumunda bulunmaktadır. Üretimin büyük bir kısmı Kahramanmaraş, Gaziantep, Şanlıurfa, Diyarbakır, Adıyaman ve Hatay illerinden karşılanmaktadır. Bunun yanı sıra Çukurova bölgesi de tarla tarımı şeklindeki biber yetiştiriciliğinde büyük öneme sahiptir.

Biber yetiştiriciliğinde ekonomik anlamda kalite ve kantite parametrelerinin düşmesinde viral etmenler ayrı bir öneme sahiptir. Açık alanda yetiştirilen biber bitkilerinde, viral etmenlerin enfeksiyonları sıklıkla meydana gelmektedir. Bu üretim koşullarında vektör kontrolünün güç olması virüslerle enfeksiyon riskini daha arttırmaktadır. Akdeniz havzasında en sık görülen biber virüsleri yaprakbitleriyle perzistent olmayan yolla taşınan *Potyvirus* cinsinde Patates Y virüsü (*Potato virus Y*, PVY), Tütün yanıklık virüsü (*Tobacco etch virus*, TEV), Biber damar beneklenme virüsü (*Pepper veinal mottle virus*, PepVMV) ve *Cucumovirus* olan Hıyar mozaik virüsü (*Cucumber mosaic virus*, CMV) ile tripslerle perzistent yolla taşınan ve *Tospovirus* cinsinde yer alan Domates benekli solgunluk virüsü (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)'dür (Moury ve Verdin, 2012).

TEV, bitki virüs alemi içerisinde en geniş familya olan *Potyviridae* familyasında *Potyvirus* cinsinde yer almaktadır. Virüs, perzistent olmayan yolla yaprakbitleriyle taşınmaktadır. Genomik yapısı yaklaşık 10 kb uzunluğunda, pozitif-sense, tek sarmallı RNA'dan oluşmaktadır. Genomun 3' terminal ucunda adenin bakımından zengin polyA' kuyruğu (Hari ve ark., 1979; Hellman ve ark., 1980) ve 5'terminal ucunda kovalent bağı ile

bağlanmış ve mesajcı RNA olarak tek ve büyük bir polipeptid sentezleyen, küçük bir genoma bağlı virion proteini (VPg) bulunmaktadır (Hari, 1981; Siaw ve ark., 1985; Shahabuddin ve ark., 1988). Bu poliprotein (340K - 350K), translasyon sonrası virüs tarafından kodlanmış üç proteaza (P1, HCPro ve NIa) işlem görerek dokuz gen ürününe işlenmektedir (Carrington ve Dougherty, 1987a, 1987b; Hellmann ve ark., 1988). TEV, biberin yanı sıra tütün ve domateslere de hastalık yapmaktadır.

Virüs izolatlarının teşhisi ve dayanıklılık mekanizmasını yıkma kapasitelerini ortaya koyan çalışmalar, ekonomik olarak önemli ürünlerin sertifikasyon programları ve ileriye dönük dayanıklı varyetelerin elde edilmesi, kullanılmasını sağlamaları bakımından önemlidir. Kırmızıbiber yetiştiriciliğinin yaygın olduğu alanlarda PVY, TEV enfeksiyonlarının kontrolü ve resesif dayanıklılığın kullanılabilmesi için mevcut dayanıklılık gen ve allelleriyle birlikte aynı zamanda PVY ve TEV’indeki genetik farklılaşmanın araştırılması zorunludur. Biberde en yaygın dayanıklılık kaynağı, resesif dayanıklılık genlerinin (*pvr*) farklı lokuslarında allellerde meydana gelen geniş farklılıklar PVY’nün farklı izolatlarıyla TEV’ne karşı en etkili kontrol mekanizmasını sağlamaktadır (Robaglia ve Caranta, 2006; Charron ve ark., 2008). Virüslere karşı resesif konukçu dayanıklılığı çalışmaları içerisinde PVY/TEV-biber genleri interaksiyonu moleküler düzeyde en iyi anlaşılır olanıdır (Sacristan ve Garcia-Arenal, 2008). Bütün *pvr2* alelleri, ökaryotik translasyon başlangıç faktörü 4E (eIF4E)’nin varyantlarını kodladığı belirtilmektedir ve az sayıdaki aminoasitin yer değiştirmesiyle de farklılaşmaktadır (Ruffel ve ark., 2002, 2004; Robaglia ve Caranta, 2006). PVY genomundaki viral kılıf protein kodlayan (VPg) bölgeye bağlı gen dizisi, *pvr2* dayanıklılığının yıkımına neden olan tek determinant bölgedir (Moury ve ark., 2004; Ayme ve ark., 2006; Ayme ve ark., 2007). Virüs VPg’sinin kapasitesi biber bitkilerindeki eIF4E ile fiziksel olarak ilişkiye girerek bitkinin dayanıklı veya hassas olma özelliğini belirlemektedir (Charron ve ark., 2008).

Biber yetiştirilen yerlerde özellikle açık arazilerde virüs enfeksiyonları yaygın olarak tespit edilmiştir. Buzkan ve ark. (2006), yaygın biber yetiştiriciliği yapılan Güneydoğu (Şanlıurfa, Gaziantep) ve Doğu Akdeniz (Kahramanmaraş, Hatay) bölgelerinde biberde yaprakbitleriyle taşınan virüs enfeksiyonlarını tespit etmek amacıyla çalışma yapmışlardır. Toplanan örnekler *Hıyar mozaik virüs* (CMV), *Yonca mozaik virüs* (AMV), *Patates X virüs* (PVX), *Patates Y virüs* (PVY), *Biber hafif benek virüs* (PepMoV) ve *Tütün yanıklık virüs* (TEV) için analiz edilmişler ve örneklerin % 64,8’inin bir veya daha fazla virüsle enfekteli olduğu belirlenmiştir. Biber yetiştiriciliğinde TEV’nün enfeksiyonlarının kontrolü, biber

genetik kaynaklarında mevcut olan ve çok geniş kapsamlı çalışılmakta olan genetik dayanıklılığın sağlanmasıyla mümkündür.

Bu tez çalışmasında, Türkiye'de biber yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı Adıyaman, Hatay, Kahramanmaraş, Kilis, Mersin ve Şanlıurfa illerinde TEV'nün yaygınlığının serolojik testlerle poliklonal antiserum kullanılarak belirlenmesi ve izolatlarının filogenetik ilişkilerinin



## 2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Biber yetiştiriciliğinde ekonomik olarak kalite ve kantite parametrelerinin düşmesinde viral etmenlerin ayrı bir önemi vardır. Türkiye’de açık alanlarda biber tarımının yapıldığı birçok yörede virüs enfeksiyonları tespit edilmiştir. Virüslerle doğrudan kimyasal mücadelenin mümkün olmaması, kültürel kontrol yöntemlerinin üreticiler tarafından yeterli düzeyde uygulanmaması ve vektörle taşınan virüslerin epidemiyolojisinin ülkemizde yeterli çalışılmaması gibi sebeplerden dolayı virüs hastalıklarından kaynaklanan zararların her geçen gün artmasına neden olmaktadır.

Shifriss ve ark., (1994) tarafından yapılan klon çalışmalarında, CMV’ün bir ırkının biberlerde şiddetli bodurluğa ve kloroza, *Vigna unguiculata* (L) Walp, ‘California Black Eye’ ve *Nicotiana tabacum* L. ‘Xanthi’de mozayik semptomuna neden olduğunu, bitkilerin araziye şaşırtılmasını takiben 3 hafta sonra yapılan surveylerde hastalık oranının % 0’dan, hasat döneminde % 88’e ulaştığını saptamışlardır. ELISA ile yaptıkları testlerde bitkilerin % 96’sının TEV, % 21’inin CMV ile % 1’inin ise PVY ile enfekteli olduğunu saptamışlardır.

Hobbs ve ark., (1996) seralarda CMV’ne dayanıklılık çalışmalarında ticari bir firmadan temin ettikleri virüsten arı PBC 535 *Capsicum annuum* hatlarına, değişik coğrafik alanlardan (ABD, Tayvan ve Dominik Cumhuriyeti) alınmış CMV izolatlarını inokule etmişlerdir. PBC 535’deki virüs izolatına bağlı olarak değişen semptom gelişimi, semptomsuz görünümünden orta şiddette semptom oluşturmaya doğru oluşmuştur. Buna ilaveten CMV izolatlarının, virüse duyarlı kontrollerde (Yolo Wonder, VR-2) çeşitli semptomlara neden olduğunu saptamışlardır. PBC 535 ve Yolo Wonder bitkilerini beş virüs izolatının her biri ile ayrı ayrı inokule etmişler ve kıyaslamaları sonucunda PBC 535’te taze bitki ağırlığındaki azalmanın Yolo Wonder’dan daha az olduğunu tespit etmişlerdir.

Virüs ırkları ve patotiplerine yönelik detaylı çalışmaların ülkesel ve/veya bölgesel kalkınmaya katkısı büyük olan bitkiler için oluşturulacak sertifikasyon programlarına katkısı büyüktür. Ancak spesifik monoklonal antiserumlar kullanılarak yapılan ELISA testi çalışmaları PVY ırklarının teşhisinde güvenilir sonuçlar vermemektedir (Gugerlı Ve Gehriger, 1980; Gugerlı ve Fries, 1983). RT-PCR bu amaçla kullanılabilir en güçlü alternatif yöntem olarak kabul edilmektedir (Singh, 1998; Weilguny ve Singh, 1998; Lorenzen ve ark., 2006).

Lindhout ve ark. (2002), potyviruslere dayanıklılık lokusunu ‘pvr’ sembolü ile ifade etmiş ve bunu teşhis etmiş oldukları altı lokus (*pvr1*, *pvr2*, *pvr3*, *Pvr4*, *pvr5*, *pvr6*) üzerinde

kronolojik sıraya göre üst bilgi olarak göstermişlerdir. Bu lokuslardaki dominant duyarlılık genini ise yine üst bilgi olarak '+' sembolü ile ifade etmişlerdir.

## 2.1.Türkiye'deki Çalışmalar

Yılmaz ve Davis (1984), Çukurova bölgesindeki açık biber alanlarında CMV, Tütün mozaik virüsü (TMV) ve PVY enfeksiyonlarını bulmuştur. Bu bölgedeki biber yetiştiriciliğinde büyük ekonomik kayıplara neden olarak, sözü edilen virüslere duyarlı çeşitlerin yetiştirilmesi olduğunu vurgulamıştır.

Palloix ve ark., (1994)'nın taze biber üretimi yapan Demre'den Adana'ya kadar olan bölgede cam seralarda veya plastik tünellerde; açık alanlarda kurutmalık biber yetiştiriciliği yapan Kahramanmaraş'ta ve salçalık biber yetiştiren Karaisalı yöresinde TMV, PepMoV, PVY, TEV ve CMV için yapmış oldukları geniş surveylerde, simptomatolojik gözlemlerin yanı sıra, toplanan örnekleri DAS-ELISA ve elektron mikroskobu gözlemleriyle kombine etmişlerdir. Araştırmalarının sonucunda virüs enfeksiyonlarının Kahramanmaraş yöresinde az olduğu tespit edilirken, pek çok bölgede özellikle Karaisalı havzasında yoğun olarak tespit edilmiştir.

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

Gümüş ve ark., (2001), tohum üreten ve pazarlayan ticari firmalardan aldıkları bezelye, biber, domates, fasulye, hıyar, kabak ve marul tohumlarında, tohumla taşınan virüsleri serolojik olarak tanılamak için yaptıkları araştırmada biber tohum örneklerinin % 84'nün CMV, %50'sinin *Tomato mosaic virus* (ToMV) ile enfekteli olduğunu göstermiştir.

Daplan ve ark., (2003) Hatay'da cv. "Hatay" veya "Geyikboynuzu" olarak adlandırılan ve bu yöreye özgü olan biber bitkilerinde PVY, CMV ve *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) enfeksiyonlarını biyolojik ve serolojik yöntemlerle araştırmışlardır. Kalın etli biber tipinde PVY'nin % 10.6, CMV'nin % 10.6, TSWV'nin % 6.3 ve CMV+PVY'nin % 4.2 oranlarında enfeksiyon yaptığını belirlemişlerdir..

Güldür ve ark., (2004) meyve dönemine gelmiş sağlıklı "Sirenae" biberlerinin gövdesine serada yetişen virüs enfekteli biber bitkilerinden izole ettikleri TMV'nü şırınga ile inoküle etmişler ve inokülasyonu takiben 15 gün sonra yaptıkları ELISA testi ile biberlerde

enfeksiyonun varlığını tespit etmişlerdir. İnokülasyondan bir ay sonra virüs simptomu gösteren biber meyvelerinden alınan örnekler üzerinde antioksidan düzeyi, C vitamini oranı ve oksidatif durumunu belirlemek için toplam peroksit içeriğini ölçmüşlerdir. TMV ile enfekteli biber meyvelerinde, toplam peroksit ve toplam fenol düzeyleri yüksek bulunurken toplam antioksidan aktivite düzeyi ve C vitamini konsantrasyonunu düşük bulmuşlardır. C vitamini ile toplam antioksidan aktivitesi arasında önemli oranda pozitif kolerasyon, toplam fenol miktarı ile peroksitler arasında ise önemli oranda negatif kolerasyon tespit etmişlerdir. TMV ile enfekteli olan biber meyvelerinde oksidan oranının yüksek, toplam antioksidan oranının ise düşük olduğunu belirlemişlerdir. Şiddetli oksidatif strese maruz kaldığını saptadıkları enfekteli biberlerin sağlıklı gelişiminin olumsuz yönde etkilendiği ve gıda kalitesinin düştüğünü ortaya koymuşlardır.

Arlı-Sökmen ve ark., (2005) Samsun'da biber alanlarından topladıkları 313 örneğin % 15.4'ünde TMV+PVY'ün karışık enfeksiyonunu tanılamıştır. Biber ekili alanlarda *Arabidopsis mosaic virus* (AMV), ilk kez bu çalışmada rapor edilmiştir. Yaklaşık 15 familyaya ait 24 yabancı ot türünün 16 tanesinde en az bir virüs enfeksiyonu rapor etmişlerdir.

Çağlar (2006), CMV izolatlarının tanılanması ve sınıflandırılması amacıyla Adana, Mersin, Hatay ve Şanlıurfa illerinde kavun, domates ve biber üretim alanlarında araştırma yapmıştır. Yapılan surveylerle topladıkları örnekleri ELISA ile testlemiş ve 60 adet kavun örneğinden 5, 62 adet domates örneğinden 9 ve 35 adet biber örneğinden 6 tanesini sadece CMV ile bulaşık olduğunu saptamıştır. Testler sonucunda pozitif olarak belirlenen örneklerden elde edilen PCR ürünlerinin RFLP çalışmasında CMV-K, CMV-D ve CMV-B izolatlarının alt grup IA'ya ait olduklarını belirlemiştir.

Buzkan ve ark., (2006) biber yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı Güneydoğu (Şanlıurfa, Gaziantep) ve Doğu Akdeniz (Kahramanmaraş, Hatay) bölgelerinden toplanan biber örneklerinde DAS-ELISA ile CMV, AMV, PVX, PVY, PMMoV ve TEV tanılamıştır. PVY'ün biberde en yaygın virüs olarak bulunurken bunu PVX, AMV, TEV, PMMoV ve CMV enfeksiyonları takip etmiştir. PeMMoV örnek alınan bütün bölgelerde ilk kez tespit edilmiştir. Aynı araştırmacı tarafından Kahramanmaraş'ta yetiştirilen biberlerde tohumla taşınan virüslerin PCR yöntemiyle teşhis edilmesine yönelik araştırmada CMV çok az oranda tohumda tespit edilmiştir. Yörede virüslerin tohumla taşınma oranının önemli olmayacak seviyelerde olduğunu söylemek mümkündür.

Buzkan ve ark., (2009) Kahramanmaraş'ta tohumla taşınan virüsleri tanılamaya yönelik biber arazilerinde surveyler yapmış. Tohumlar üzerinde yapılan bu araştırmada PCR yöntemiyle testledikleri örneklerde çok az oranda CMV gözlenmiştir.

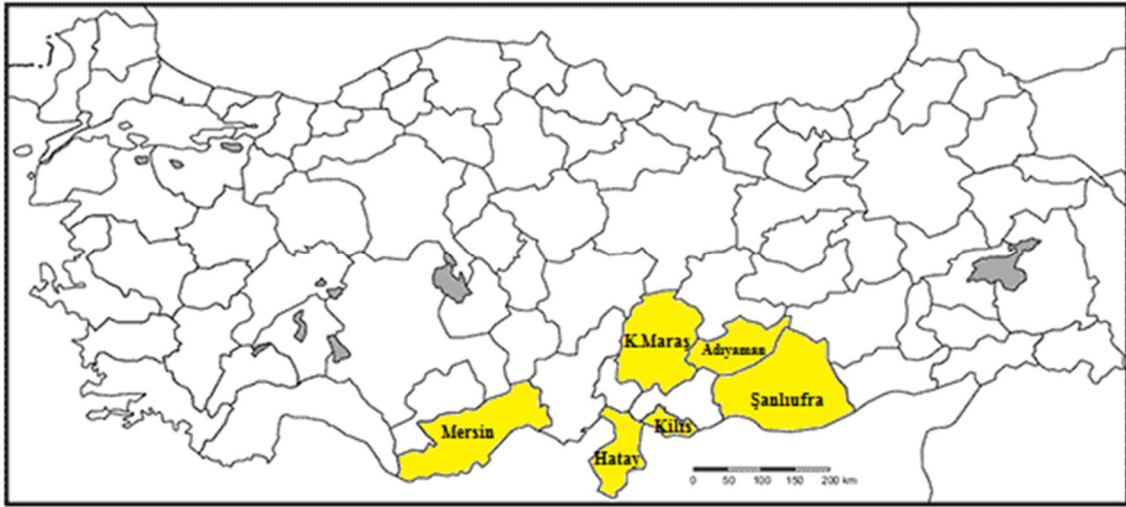
Buzkan ve ark., (2013) Türkiye ve Tunus'ta biber üretim alanlarından PVY ve CMV'ünü her iki ülkede, TEV'ünü ise sadece Türkiye'de tespit etmişlerdir. Bununla birlikte örneklerin % 70'in üstünde görülme sıklığıyla en yaygın Polerovirüsleri belirlemişlerdir. Kısmi dizi analizleri sonucunda Polerovirüslerin Şekerpancarı batı sarılık virüsü (*Beet western yellows virus*, BWYV) ve Biber sarı yaprak kıvrıcılık virüs (*Pepper yellow leaf curl virus*, PYLCV)'ü olduğunu bildirmişlerdir. Hatay'dan 11, Monastır, Kairouan ve Gabes (Tunus)'ten ise 7 farklı biber üretim alanının tarandığı çalışmalarında PVY, CMV, TEV, ToMV, PeMMoV, TSWV ve Polerovirus etmenlerini CABYV antiserumu kullanarak DAS-ELISA ile araştırmışlardır. CABYV antiserumu ile pozitif bulunan örneklerin nükleik asitleri, virüs spesifik primerlerle RT-PCR kullanılarak çoğaltılmıştır. PCR DNA'larının tek yönlü dizi analizleri, Türkiye'de ilk kez PYLCV varlığını göstermiştir. Virüsün DNA dizisinin Gen Bankasında kayıtlı benzer dizilerle karşılaştırması sonuçlarına göre, etmenin isminin Biber sarı damar virüsü (*Pepper vein yellows virus*, PVYV) olarak değiştirilmesini teklif etmişlerdir.

Buzkan ve ark., (2015) Kahramanmaraş, Hatay ve Gaziantep'te biber alanlarından topladıkları biber örneklerinde, PVY ve TEV'lerinin populasyon dinamiğini KP ve viral protein gen bölgelerine göre incelemişlerdir. Bütün izolatların benzer yapıya sahip olduğu, bunun nedeninin her iki virüsün izolatlarının farklılaşmasını çok uzun zaman önce tamamlamış olmasından kaynaklı olabileceğini ifade etmiştir. PVY izolatları KP ve viral protein gen bölgesi nükleotid dizinleri benzerliklerine göre C1 grubunda yer almıştır. Türk potyvirus izolatlarının *pvr2<sup>1</sup>* dayanıklılık allelini kırdığı için (0,1) patotipi olduğu bildirilmiştir. PVY kontrolü için *pvr<sup>4</sup>* dominant dayanıklılık geni etkiliyken, TEV için bunu söylemek mümkün değildir. PVR ve TEV'ün (0,1) patotiplerine dayanıklılık için *pvr2<sup>2</sup>* dayanıklılık alleli etkilidir.

### 3.MATERYAL VE METOT

#### 3.1.Materyal

Bu araştırma 2011 ve 2013 yıllarında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nde biber potyvirusleri üzerine yapılan önceki çalışmalarda toplanmış ve TEV tanısı konulmuş izolatların yanı sıra, 2014 yılında Doğu Akdeniz (Hatay, Kahramanmaraş, Mersin) ve Güneydoğu Anadolu (Adıyaman, Kilis ve Şanlıurfa) Bölgelerinde biber yetiştiriciliğinin ekonomik olarak önemli olduğu illerdeki biber alanlarından alınan biber yaprak ve meyve örnekleriyle yürütülmüştür (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde survey yapılan iller

Örneklerde TEV'ün serolojik tanısında virüs spesifik poliklonal antiserum kullanılmıştır. Antiserum ticari olarak temin edilmiştir.

Alınan bitkisel örnekler (yaprak ve meyve), plastik torbalarda buz dolu kaplarla laboratuvar ortamına getirilmiş ve analizler için kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır.

#### 3.2.Metot

##### 3 .2.1. Arazi Surveyi , Simptomatolojik Gözlem ve Bitki Örneklerinin Toplanması

Surveyler, biber bitkilerinde meyve tutum döneminden başlayarak, meyve olgunlaşma ve hasad dönemlerini kapsayacak şekilde haftalık olarak gerçekleştirilmiştir. Surveyler Ben Khalifa ve ark., (2009)'nın önerdiği şekilde yaprak örneklerinin yanı sıra uzun süre saklanabilir olmalarından dolayı genç meyvelerde (bitki başına 1 adet meyve) örneklenmiştir. Bitkilerde örnekleme güdümlü olarak yapılmış, yapraklarda mozaik, yaprak damar nekrozları,

yaprak kıvrılması, beneklenme gibi simptomları taşıyan bitkiler dikkate alınmıştır. Survey alanları iki gruba ayrılarak: A (< 0.5 ha), B (0.5–1 ha). Ortalama 5-10 örnek “A” alanlarından, 10-15 örnek “B” alanlarından alınmıştır. Örnekleme arazi içerisinde “W” desenine göre yapılmıştır. Surveylerde TEV enfeksiyonları tespit edilen bölgelerde alanlar geniş ve alınan örnek sayısı daha yüksek tutulmuştur.

Alınan bitkisel örnekler (yaprak ve meyve), plastik torbalarda buz dolu kaplarla laboratuvar ortamına getirilmiş ve analizler için kullanılmak üzere +4°C’de saklanmıştır.

### 3.2.2. Serolojik Test

DAS-ELISA testi 2014 yılında, araştırma projesi için toplanmış taze bitkisel materyallerde TEV tanısı koymak ve izolat seçimi yapmak için uygulanmıştır. Bitkisel örnekler TEV poliklonal antiserum (Agdia) kullanılarak DAS-ELISA yöntemi ile testlenmiştir (Clark ve Adams, 1977). Testlemelerde kullanılacak pozitif ve negatif kontroller antiserum temin edilen firmadan sağlanmıştır. ELISA okuyucuda negatif kontrollerde okunan değerlerin 2-2,5 katı değerlere sahip örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir.

Biber yaprak ve meyve örneklerinden 100 mg tartılarak, TEV (Agdia) için tavsiye edilen ezme tamponu içerisinde 1:10 oranında kullanılarak ezilmiş ve testlerde kullanılincaya kadar +4°C’de saklanmıştır.

- (i) ELISA plakaları TEV poliklonal antiserum ile kaplanmıştır. Kaplama işlemi için antiserumlar üretici firmaların belirttiği oranlarda kaplama tamponu (ek 1) içinde sulandırılmıştır. Plakalar 100 µl/çukur olacak şekilde kaplanmış ve 37°C’de 2 saat süreyle, nem çemberi oluşturularak saklama kaplarında bekletilmiştir.
- (ii) İnkübasyon sonunda plakalar yıkama tamponuyla (EK 1) 3 kez ve 3 dak arayla yıkanmış ve iyice kurulanmıştır.
- (iii) Ezme tamponuyla (EK 1) hazırlanmış örnekler 100 µl/çukur olacak şekilde, her örnek iki tekerrürlü olarak plakalara konulmuştur. Plakalar +4°C’de bir gece (16 saat) bekletilmiştir.
- (iv) Plakalar yıkama tamponuyla 3 kez ve 3 dak arayla yıkanmış ve iyice kurulanmıştır.

- (v) Antiserum+enzim konjugasyonu antiserum üretici firmaların tavsiye ettiği oranlarda, konjugat tamponu (EK 1) içinde seyreltilmiş ve 100 µl/çukur olacak şekilde çukurlara konulmuştur. Plakalar 37°C'de 2 saat süreyle, nem çemberi oluşturulmuş saklama kaplarında bekletilmiştir.
- (vi) Plakalar yıkama tamponuyla 3 kez ve 3 dak arayla yıkanmış ve iyice kurulanmıştır.

Alkalin fosfataz substratı 1mg/ml olacak şekilde substrat tamponu (ek 1) içinde hazırlanmış ve 100 µl/çukur olacak şekilde çukurlara konulmuştur. Plakalar ışık almayacak şekilde saklama kabında, oda sıcaklığında bekletilerek çukurlardaki renk değişimi izlenmiştir. Pozitif kontrollerde renk değişimin gözlemlendiği ilk 30 ve 60 dakika süre aralıklarında 405 nm dalga boyunda, ELISA okuyucusunda okumalar yapılmıştır. Negatif kontrollerden 405 nm dalga boyunda elde edilen değerlerin en az iki katından fazla absorbans değerine sahip olan örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

### **3.2.2.2. Toplam Nükleik Asit (TNA) İzolasyonu**

Viral nükleik asit izolasyonu Tri Reagent kit (Molecular Research Center Inc.) kullanılarak yapılmıştır. TNA izolasyonunda kullanılan tampon çözeltilerinin içerikleri ve hazırlanma yöntemleri EK 2' de yer almaktadır.

- (i) Yaklaşık 0.5 g taze meyve örneği soğutulmuş porselen havan içerisinde 1:10 (ağırlık/hacim) oranında Tri Reagent ile ezilmiştir. Mikrosantrifüj tüplere aktarılan karışım oda sıcaklığında 5 dak bekletilmiştir.
- (ii) Üzerine 0,2 ml/ml Tri-Reagent olacak şekilde kloroform eklenmiştir. Karışım 14.000 devir/dak'da 15 dak santrifüj edilerek, fazlara ayrılması sağlanmıştır. Üstte kalan sıvım kısım alınmış ve temiz mikrosantrifüj tüplere aktarılmıştır.
- (iii) RNA çökmesi 0.5 ml isopropanol eklenerek, oda sıcaklığında 10 dak bekletilerek yapılmıştır. Karışım 14.000 devir/dak'da 10 dak santrifüj edilmiş ve RNA mikrosantrifüj tüplerin tabanında toplanmıştır.
- (iv) RNA çökeltisi 1ml %70'lik etil alkol kullanılarak, 10.000 devir/dak'da 10 dak santrifüj edilerek yıkanmıştır.

(v) RNA çökeltisi 50 µl saf su ile homojenize edilmiş ve moleküler testleme çalışmalarında kullanılmak üzere -20°C'de depolanmıştır.

### 3.2.2.3. Viral RNA'nın Tersine Transkripsiyonu ve Tamamlayıcı DNA (cDNA, complementary DNA) Sentezi

TNA'ların tersine transkripsiyonu ve cDNA sentezi 2011 ve 2013 yıllarında TEV tanısı konmuş örneklerden TNA preperasyonları kullanılarak, Moury ve ark., (2004)'e göre yapılmıştır. Reaksiyon için 3 µl TNA, 10 µM 1 µl heterolog primer (Çizelge 3.2.) karışımı sırasıyla 70 °C'de 5 dak ve +4°C'de 5 dak bekletilmiştir.

Karışıma 4 µl 5X tersine transkripsiyon tamponu, 0.8 µl 10 mM dNTP ve 0.5 µl *Maloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV) Reverse Transcriptase (20.000 U) enzim eklenmiştir. Reaksiyon karışımı 42 °C'de 1 saat bekletilerek cDNA sentezi tamamlanmıştır.

Primer	Dizi	DNA bandı (bç)
KP-TEV-forward	5'- TGCTGAYGCGYGGYAAGAAGAAAG -3'	768
KP-TEV-reverse	5'- CCCTAATAGTGTGTGCATGTTACGG -3'	

### 3.2.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyon (Polymerase Chain Reaction, PCR)

PCR analizi elde edilen cDN'lar kullanılarak 50 µl'lik karışım ile yapılmıştır. Karışımda 45 µl PCR reaksiyonunda (10 mM Tris-HCl pH 8.3), 50 mM KCL, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP'nin her birisi, 120 pM virüs spesifik homolog ve heterolog primerler(Çizelge 3.2.), 1U *Taq* DNA polymerase (Fermentas) ve steril su olarak hazırlanmış ve 5 µl cDNA eklenmiştir. PCR programı ise 95°C'de 30 sn, 55°C' de 45 sn ve 72°C'de 90 sn olarak belirlenmiştir. Bütün reaksiyonlarda son uzatma sıcaklığı 72°C'de 10 dak olacak şekilde ayarlanmış, 40 döngü uygulanmıştır.

Çizelge 3.2. TEV-KP bölgesinden hazırlanan PCR primerleri

Primer	Dizi	DNA bandı (bç)
KP-TEV-forward	5'- TGCTGAYGCYGGYAAGAAGAAAG -3'	768
KP-TEV-reverse	5'- CCCTAATAGTGTGTGCATGTTACGG -3'	

### 3.2.2.5. PCR DNA'larının Elektroforetik Analizi

PCR çalışmasında elde edilen DNA ürünlerinin elektroforetik analizleri % 1,5'lük agaroz jel üzerinde 1XTAE (0.04 M Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0) tamponu kullanılarak yapılmıştır. Elektroforetik analizlerde "100 bp DNA standartı" (Fermentas) kullanılmıştır. Agaroz jel etidium bromid boyamasından sonra UV transilluminator üzerinde gözlenmiş, jel fotoğrafları "GelDoc-It imaging system" ile çekilmiştir.

### 3.2.2.6. Nükleik Asit Dizi Analizi

RT-PCR DNA'larının tek yönlü doğrudan dizilemesi, GENOSCREEN (Fransa) firmasına yaptırılmıştır. Elde edilen dizilerin NCBI (The National Center for Biotechnology Information) Gen Bankasından kayıtlı benzer dizilerle karşılaştırması Blastn (Altschul ve ark., 1997) programı aracılığı ile yapılmıştır. Diziler MEGA5 yazılımı (Tamura ve ark., 2011) kullanılarak ClustalW programı ile hizalanmış filogenetik ağaç Neighbor Joining metodu ile Tamura-Nei modelinde 1000 bootstrap tekrarlanacak şekilde oluşturulmuştur.

### 3.2.3. İzolatların *pvr* Alleleriyle İlişisinin Belirlenmesi

Araştırma alanı içerisinde toplanmış olan TEV izolatlarının patotip çeşitliliğini *pvr* dayanıklılık alleleriyle olan ilişkileri referans biber genotipleri Yolo Wonder (YW, *pvr2<sup>+</sup>*), Yolo Y (YY, *pvr2<sup>1</sup>*), Florida VR2 (*pvr 2<sup>2</sup>*) ve W4 (*pvr 2<sup>3</sup>*) üzerinde araştırılmıştır. Biber tohumları 1:1 oranında bahçe toprağı:torf ile hazırlanmış karışıma ekilmiştir. Bitkiler 2-3 gerçek yapraklı konuma geldiklerinde mekanik inokülasyon çalışmaları için kullanılmışlardır. İnokülasyonlar Moury ve ark. (2004)'nin belirttiği protokole ile yapılmıştır. Yaprak örnekleri, 4 hacim olacak şekilde, %2 (ağırlık/hacim) DIECA, 20 mg/ml aktif kömür ve 20 mg/ml karborandum içeren 0.03 M fosfat tamponu (pH 7.0) ile ezilmiş ve indikatör bitkiler üzerinde

inokulasyonlar gerçekleştirilmiştir. İnokulasyonlar ELISA testlerinde virüs enfekteli bulunan her örnek için 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Negatif kontroller, sağlıklı indikatör bitkilere sadece tampon kullanılmak suretiyle inoküle edilerek hazırlanmıştır. Bitkiler iklim odalarında 16 saat fotoperyot, 24°C sıcaklık, %60 oransal nem bulunan şartlara konulmuş ve simptom çıkışı için periyodik olarak gözlenmiştir.



## 4.BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1.Simptomatolojik Gözlemler

Survey çalışmalarında vejetasyon döneminde (meyve tutum dönemi ve hasad dönemine yakın dönemler) viral etmenin yaprak ve meyvelerde gösterdiği belirtilere dikkat edilmiştir. Bitkilerde genel olarak, yapraklarda mozaik (Şekil 4.1.), damar aralarında renk açılması (Şekil 4.2.), yukarı doğru kıvrılma ve sararma (Şekil 4.3), yapraklarda mozaik ve sararma (Şekil 4.4.) belirtileri gözlenmiştir.



Şekil 4.1. Yapraklarda mozaik



Şekil 4.2. Damar aralarında renk açılması



Şekil 4.3. Yapraklarda yukarı kıvrılma ve sararma



Şekil 4.4. Yapraklarda mozaik ve sararma

Toplam altı lokasyonda 52 biber alanından 561 biber bitkisinden örnek alınmıştır (Çizelge 4.1.). Survey çalışmalarından alınan bitkisel örneklerde ELISA testiyle TEV tanılanmasına göre en fazla örnek Hatay ilinden alınmıştır.

Çizelge 4.1. Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde Survey yapılan alanlar ve örnek sayıları

LOKASYON	SURVEY YAPILAN ARAZİ SAYISI	TOPLAM ÖRNEK SAYISI
Adıyaman	2	23
Hatay	26	294
Kahramanmaraş	3	17
Kilis	8	93
Mersin	8	75
Şanlıurfa	5	59
<b>TOPLAM</b>	<b>52</b>	<b>561</b>

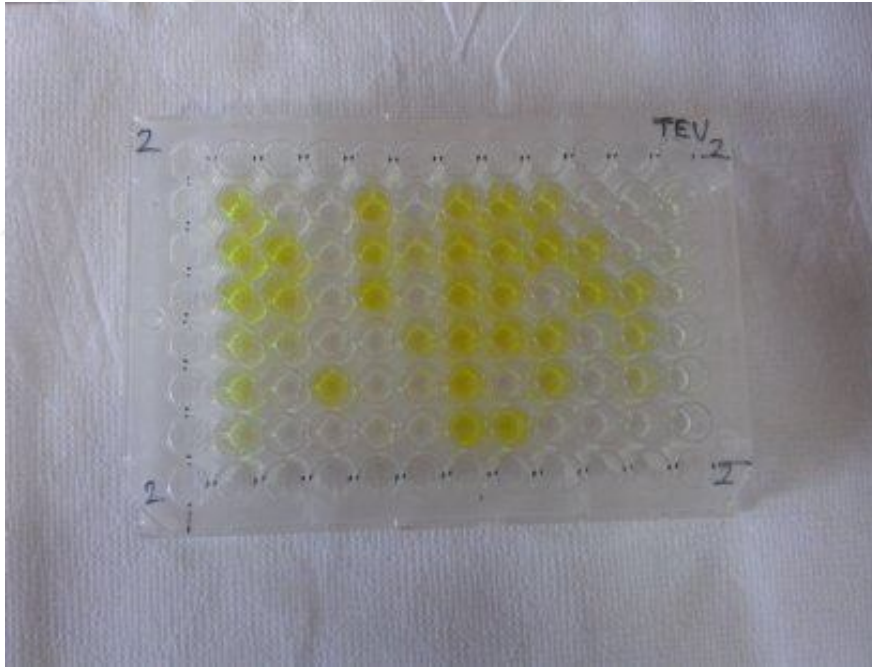
## 4.2. Serolojik Testler

### 4.2.1. DAS-ELISA ile Biber Örneklerinde TEV Tanınması

Adıyaman, Hatay, Kahramanmaraş, Kilis, Mersin ve Şanlıurfa illerinden toplanan 561 örnek, TEV'e spesifik poliklonal antiserum ile DAS-ELISA yöntemiyle testlenmiştir. Örnekler kolorimetrik (Şekil 4.2.1.), olarak ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyunda okunan OD (optical density) değerlerine göre değerlendirme yapılmıştır. Testlenen toplam 561 örneğin 72 tanesinde (% 12,83) virüs saptanmıştır. Survey yapılan illerde testlenen örnekler içinde en yüksek bulaşıklık oranı % 18,7 (55/294) Hatay ilinde tespit edilirken en düşük bulaşıklık oranı %3,38 (2/59) Şanlıurfa ilinde tespit edilmiştir. Adıyaman ve Kahramanmaraş illerinde TEV ile bulaşık biber bitkisi bulunmamıştır. Mersin'deki biber alanlarında TEV'nün bulunma oranı % 10,66 olarak hesaplanmış ve Hatay ilinden sonra virüsün en yaygın olduğu ikinci il olmuştur.

Çizelge 4.2. DAS-ELISA testinde lokasyonlara göre TEV'nün yaygınlık durumu

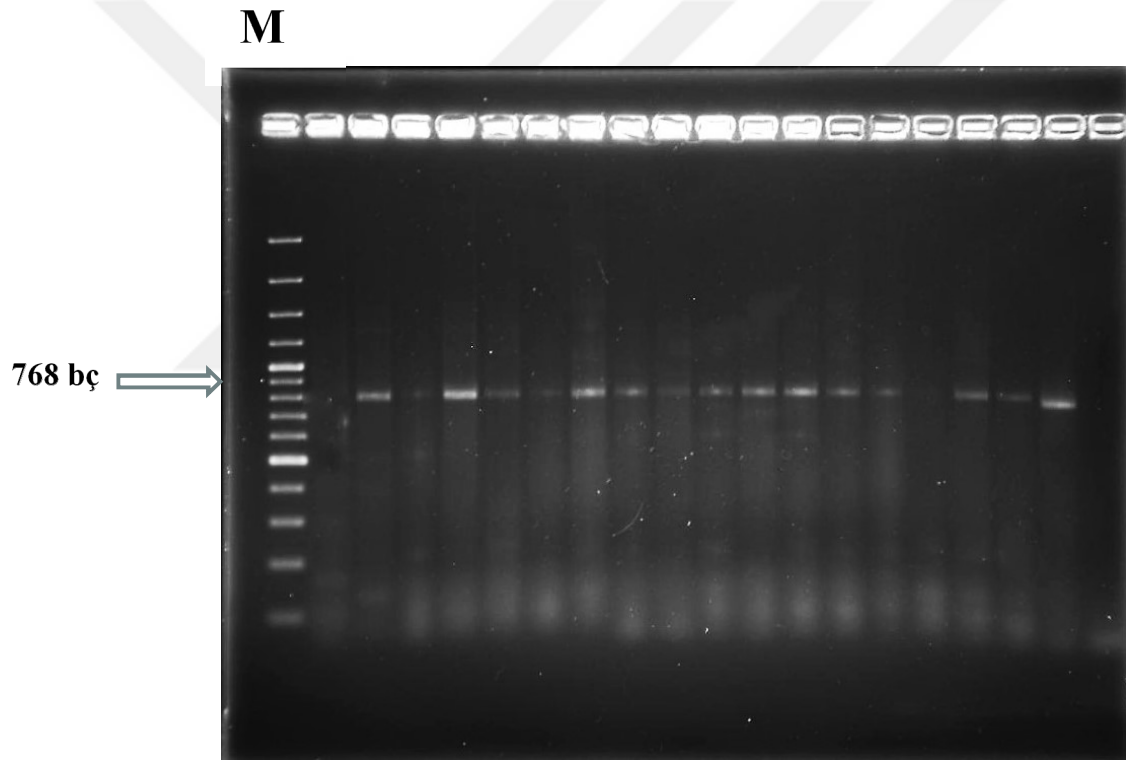
ÖRNEK ALINAN BÖLGE	TOPLAM TESTLENEN	ENFEKTELİ	YÜZDE (%)
Hatay	294	55	18,70
Adıyaman	23	-	0
Şanlıurfa	59	2	3,38
Kahramanmaraş	17	-	0
Kilis	93	7	7,52
Mersin	75	8	10,66
<b>TOPLAM</b>	<b>561</b>	<b>72</b>	<b>12,83</b>



Şekil 4.2. DAS-ELISA testinde TEV tanılanmış örneklerde kolorimetrik analiz sonucu

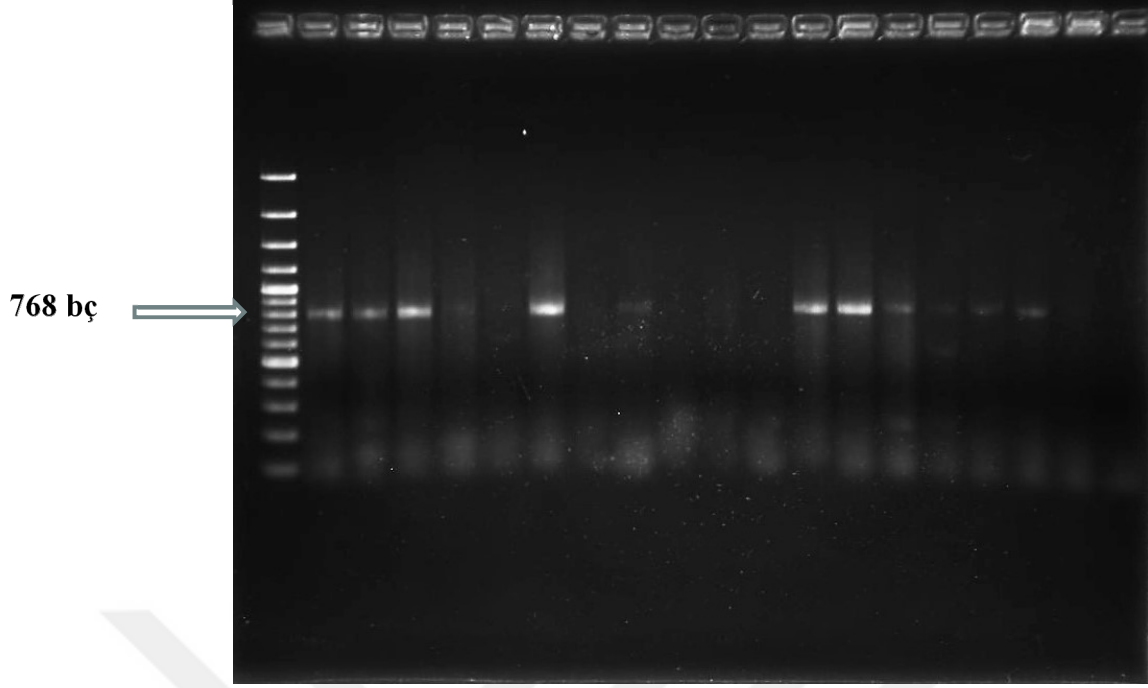
### 4.3. TEV'nün Filogenetik Analizi

Biber yaprak ve meyve örneklerinden elde edilen TNA'lar ile hazırlanmış cDNA'ların TEV'ün kılıf protein (KP) gen bölgesini çoğaltmak için yapılan PCR analizinde 768 bç büyüklüğünde DNA bantları elde edilmiştir. Hatay Bölgesi'nde biber alanlarından tanımlanan TEV-KP izolatlarının 2011 ve 2013 yıllarında tanımlanmış olan TEV-KP izolatları ile gen bankasına kayıtlı benzer izolat dizilerinin "Neighbor-joining" yöntemine göre karşılaştırmalı olarak hazırlanmış filogenetik ağacı oluşturulmuş olup ağaç topolojisi kuvveti 1,000 bootstrap alınmıştır.



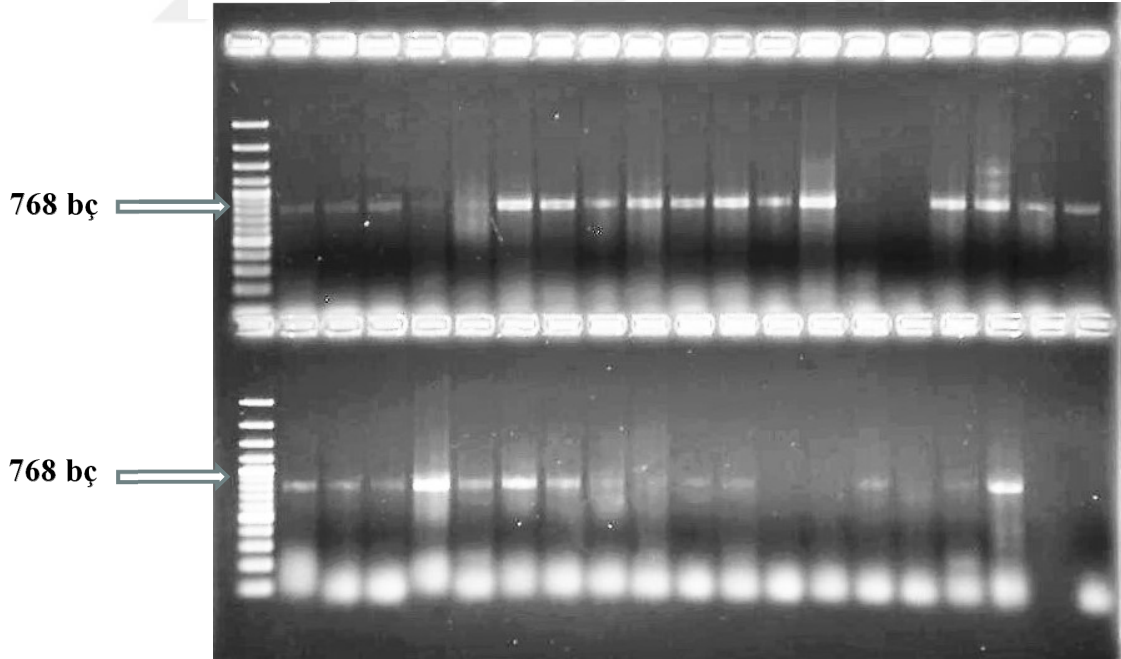
Şekil 4.3. Biber yaprak ve meyvelerinden izole edilen TNA'lardan hazırlanan cDNA'ların PCR DNA'larının elektroforetik analizi. Marker (M): 100 bç DNA Standartı (Fermentas).

**M**



Şekil 4.4. Biber yaprak ve meyvelerinden izole edilen TNA'lardan hazırlanan cDNA'ların PCR DNA'larının elektroforetik analizi. Marker (M): 100 bç DNA Standartı (Fermentas).

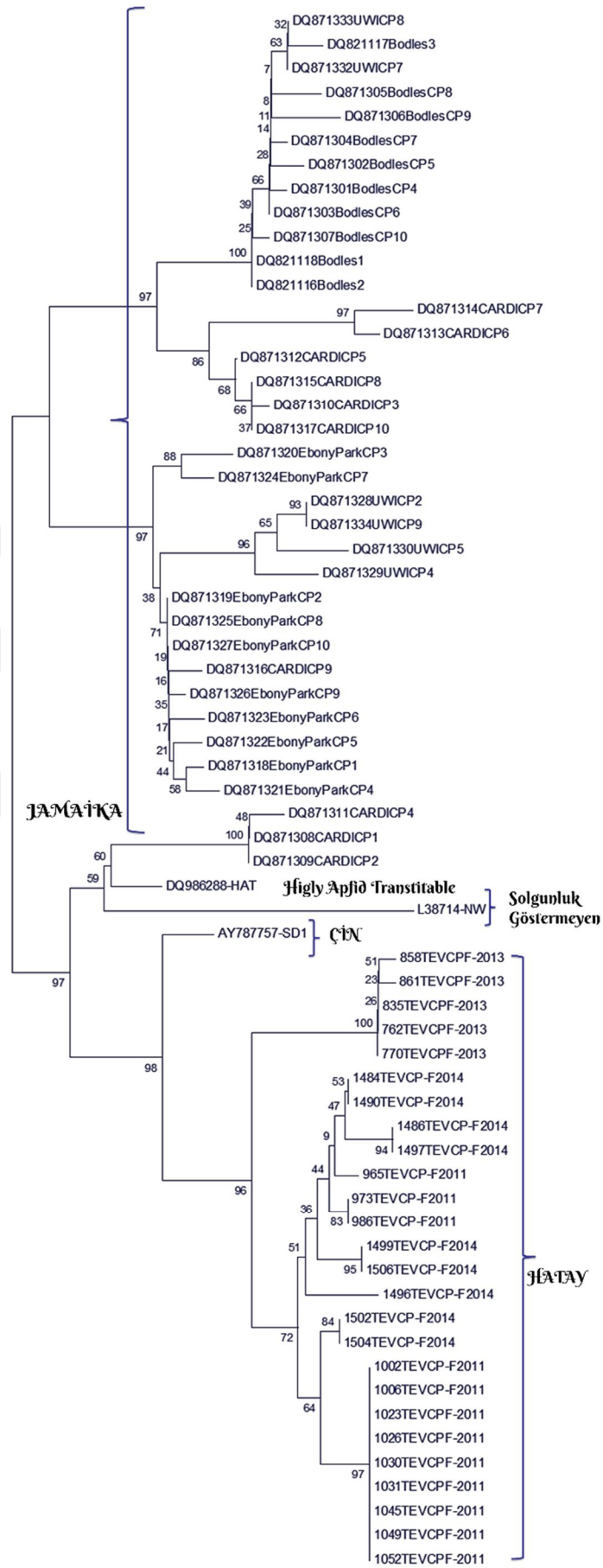
**M**



Şekil 4.5. Biber yaprak ve meyvelerinden izole edilen TNA'lardan hazırlanan cDNA'ların PCR DNA'larının elektroforetik analizi. Marker (M): 100 bç DNA Standartı (Fermentas).

Hatay'dan alınan örneklerde TEV-KP tanımlanan 762, 770, 835, 858 ve 861 numaralı beş izolatın filogenetik analizi yapılarak birbirleriyle ve gen bankasında kayıtlı diğer izolatlarla aralarındaki akrabalık ilişkileri incelenmiştir. Hatay izolatlarının KP geni nükleotid dizinleri, Buzkan ve ark. (2015)'nin rapor ettiği Hatay izolatlarının nükleotid dizinleriyle yüksek benzerlik göstermiştir. İzolatlar daha önceki yıllarda toplanan izolatlardan ayrı bir gruba yerleşmişlerdir. Hatay izolatları büyük oranda yıllara göre değişecek şekilde 3 farklı grup oluşturmuştur. 2011 yılında alınmış 3 izolat ile 2014 yılında toplanan 2 izolat aynı grup içinde yer alırken, 2013 yılında toplanan izolatlar ayrı bir grup oluşturmuştur.

Jamaika orijinli TEV izolatlarının üç ayrı grup altında toplandığı Şekil 4.6. da görülmektedir. Bu izolatlardan bir kısmı ayrılarak Çin izolatına yaklaşmıştır. Aralarında yaprak bitleri ile hızla yayılabilen bir izolatın da yer aldığı bu grubun Çin izolatından sonra Türkiye'den toplanan izolatlara yakın olduğu görülmektedir. Sonuç olarak çalışmada toplanan izolatlar etmenin kılıf protein bölgesi dikkate alındığında Çin izolatına (AY787757-SD1) yakın bulunmuştur.



Şekil 4.6. Hatay Bölgesi'nde biber alanlarından tanılanan TEV-KP izolatlarının 2011 ve 2013 yıllarında tanılanmış olan TEV-KP izolatları ile gen bankasına kayıtlı benzer izolat dizilerinin “Neighbor-joining” yöntemine göre karşılaştırmalı olarak hazırlanmış filogenetik ağacı. Ağaç topolojisi kuvveti 1,000 bootstrap alınmıştır.



## 5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Araştırmada Doğu Akdeniz (Kahramanmaraş, Hatay, Mersin) ve Güneydoğu Anadolu (Adıyaman, Şanlıurfa, Kilis) Bölgelerinden alınan toplam 561 biber (yaprak ve meyve) örneğinin yapılan serolojik (ELISA) ve Moleküler (PCR) testlemeler sonucunda %12,83 (72/561) oranında TEV ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. TEV'nün en yaygın olduğu il /18.7 (55/294) Hatay olurken, en az TEV enfeksiyonuna % 3,38 (2/59) Şanlıurfa ilinde rastlanmıştır. Adıyaman ve Kahramanmaraş illerinde TEV ile enfekteli biber örneği saptanmamıştır.

TEV izolatlarının patotip çeşitliliği ve *pvr* dayanıklılık alleleriyle olan ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla referans biber genotipleri Yolo Wonder (YW, *pvr2<sup>+</sup>*), Yolo Y (YY, *pvr2<sup>1</sup>*), Florida VR2 (*pvr 2<sup>2</sup>*) ve W4 (*pvr 2<sup>3</sup>*) üzerinde mekanik İnokulasyon yapılmıştır. İnokulasyonun ikinci haftasından itibaren W4 (*pvr 2<sup>3</sup>*), Yolo Y (*pvr 2<sup>1</sup>*) Yolo Wonder (*pvr 2<sup>+</sup>*) ve Florida VR2( *pvr2<sup>1</sup> 774* ) alellerinin izolatlara dayanım göstermemesi sonucu yapraklarda mozaik, sararma, yukarı doğru kıvrılma şeklinde simptomlar gözlenmiştir. Florida VR2( *pvr2<sup>1</sup>*) 1002 numaralı TEV izolatı üzerinde ise simptom göstermemiştir. İnokulasyonun üçüncü haftasını takiben yapraklardaki sararmaların kloroz ve nekrozlara dönüşmeye başladığı gözlenmiştir.

Simptom gösteren ve göstermeyen bitkilerden alınan örnekler ile TEV poliklonal antiserum ile yapılan ELISA sonucunda 1002 ve 774 numaralı TEV izolatlarının W4 (*pvr 2<sup>3</sup>*), Yolo Y (*pvr 2<sup>1</sup>*) ve Yolo Wonder (*pvr 2<sup>+</sup>*) alellerine dayanım göstermediği saptanmıştır. Florida VR2 (*pvr2<sup>1</sup>*) alellinin ise TEV'nün 1002 numaralı izolatına dayanım gösterdiği, 774 numaralı izolatına ise dayanım göstermediği sonucu elde edilmiştir (Çizelge 5.1.).

Çizelge 5.1. *pvr* alellerinin TEV izolatlarına karşı gösterdiği reaksiyonlar

ALELLER	İZOLATLAR	
	1002	774
W4 <i>pvr 2<sup>3</sup></i>	1,573	2,103
Florida VR2 <i>pvr 2<sup>2</sup></i>	0,026	1,989
Yolo Y (YY) <i>pvr 2<sup>1</sup></i>	1,716	1,861
Yolo Wonder (YW) <i>pvr 2<sup>+</sup></i>	1,909	1,795

Bu alışmada Türkiye’de yayılış gösteren TEV’nn kılıf bölgesi dikkate alındığında Çin’de bulunan TEV’ne benzerlik gösterdiği anlaşılmıştır. TEV’ne dayanıklılık mekanizmasının anlaşılması için virüs populasyonu karakterize edilmeli, buna bağlı olarak patotip çeşitliliği araştırılmalıdır.



## 6.TARTIŞMA

Konukçu-patojen ilişkisinin organizma farklılaşmasında, konukçuyla patojen yaşam döngüsünün birbirine bağımlı olarak süregelmesi ve genlerin kompleks ve dinamik etkisiyle evrimsel gelişimlerinin etkisi büyük olmaktadır. *Capsicum* spp. türleriyle potyvirusler arasındaki ilişki, eIF4E-ortamlı dayanıklılık mekanizmasının anlaşılmasında fonksiyonel ve evrimsel çalışmalar için mükemmel bir sistem olarak karşımıza çıkmaktadır.

Biber kültürlerinde yaygın enfeksiyonları tanımlanmış potyviruslerin dayanıklılık proteinleri ve avirulent proteinleri moleküler düzeyde karakterize edilmiştir. *Potyvirus* cinsine bağlı beş virüs içerisinde *Patato Y virus* (PVY) ve *Tobacco etch virus* (TEV)'leri dünya'da biberlerde yaygın olarak rapor edilmiştir (Green ve Kim, 1991). Bu patojendeki farklılaşma problemi dikkate alındığında, dayanıklılık konusu *Capsicum* spp. türleriyle potyvirusler arasındaki ilişkiden kaynaklanan olağan bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır. *Capsicum* hatlarının ortalama %40'ı PVY'nin yaygın ırklarına dayanıklılık taşıırken, resesif genetik dayanıklılık faktörü potyviruslere karşı mevcut en yaygın faktör olarak tarif edilmiştir (Kyle ve Palloix, 1997; Palloix ve Daubeze, INRA, Fransa; yayınlanmamış sonuç). Bunlar içerisinde *pvr<sup>2</sup>* geni ıslah programlarında en etkili ve stabil kaynak olarak bildirilmiştir (Greenleaf, 1986). *pvr<sup>2</sup>*, eIF4E kodlayan gen olarak bilinmektedir. Gen üzerinde *Capsicum annum*'da dayanıklılık sağlayan *pvr<sup>2</sup>* ve *pvr<sup>2</sup>* dayanıklılık allelleri tanımlanırken, yakın zamanda *C. chinense*'de *pvr<sup>1</sup>* (aynı gen üzerinde *pvr<sup>2</sup>* ve *pvr<sup>1</sup>* allelleri) bulunmuştur (Kang ve ark., 2005; Ruffel ve ark., 2004, 2002). Bu alleller eIF4E'deki I ve II bölgelerinde bulunan aminoasit birimlerindeki farklılaşmadan sorumlu olmayıp aynı zamanda bu bölgedeki dayanıklılık etkisinde de etkilidir. *pvr<sup>2</sup>* PVY("0" patotip)'nin yaygın ırklarına karşı etkiliyken *pvr<sup>2</sup>* PVY-0 ve PVY-0,1 patotipleri ve TEV ırklarını kontrol etmektedir. *pvr<sup>1</sup>* alleli ise PVY, TEV ve PMMoV ırklarına karşı etkilidir (Kyle ve Palloix, 1997). Virüs açısından VPg'nin merkez bölgesinde aminoasit birimlerindeki farklılaşma PVY enfekteli biber genotiplerinde homozigot *pvr<sup>2</sup>* ve *pvr<sup>2</sup>*'nin sağladığı dayanıklılık bulunmaktadır (Moury ve ark., 2004). Benzer şekilde TEV'nün avirulashlığında etkili olarak VPg bölgesi tanımlanmıştır VPg (Kang ve ark., 2005). TEV'ne dayanıklılık mekanizmasının anlaşılması için virüs popülasyonu karakterize edilmeli, buna bağlı olarak patotip çeşitliliği araştırılmalıdır.

## 7. KAYNAKLAR

- Agrios G. N., 1997. Plant Diseases Caused by Viruses, Plant Pathology, Third Edition, *Academic Press, INC.*, California, 803s.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-402.
- Arlı-Sökmen, M., Mennan, H., Sevik, M.A. and Ecevit, O., 2005. Occurrence of Viruses in Field-grown Pepper Crops and Some of Their Reservoir Weed Hosts in Samsun, Turkey. *Phytoparasitica* 33(4): s.347-358.
- Ayme, V., Souche, S., Caranta, C., Jacquemond, M., Chadoeuf, J., Palloix, A., Moury, B., 2006. Different mutations in the genome-linked protein VPg of potato virus Y confer virulence on the *pvr23* resistance in pepper. *Mol.Plant Microbe Interact* 19 (5): s.557-563.
- Ayme, V., Petit-Pierre, J., Souche, S., Palloix, A., Moury, B. 2007. Molecular dissection of the potato virus Y VPg virulence factor reveals complex adaptations to the *pvr2* resistance allelic series in pepper. *Journal of General Virology* 88, s.1594-1601.
- Ben Khalifa, M., Simon, V., Marrakchi, M., Fakhfakh, H., Moury, B., 2009. Contribution of host plant resistance and geographic distance to the structure of Potato virus Y (PVY) populations in pepper in northern Tunisia. *Plant Pathology* 58, 763-772.
- Buzkan, N., Demir, M., Öztekin, V., Mart, C., Çağlar, B. K., Yılmaz, M. A., 2006. Evaluation of the Status of Capsicum Viruses in the Main Growing Regions of Turkey. *EPPO Bulletin* 36: 15- 19.
- Buzkan, N., Yüzer D., 2009. Kahramanmaraş Kırmızı Biberlerinde Tohumla Taşınan Virüslerin Moleküler Tanısı. *Alatarım* 8 (1): 1-7.
- Buzkan, N., Arpacı B. B., Simon V., Fakhfakh H., Moury B., 2013. High Prevalence of Poloroviruses in Field-Grown Pepper in Turkey and Tunisia. *Arch Virol.* 158(4): 881-815.

- Buzkan N., Arpacı B.B., Görsoy G., Zencirkiiran M., Moury B., 2015. Genetic variability of Potato Virus Y (PVY) and Tobacco etch virus (TEV) from naturally infected pepper fields in the Hatay region of Turkey. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*,
- Caranta C., Lefebvre V., Palloix A., Polygenic resistance of pepper to potyviruses consists of a combination of isolate-specific and broad-spectrum quantitative trait loci, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 10: s 872-878, (1997).
- Charron, C., Nicolai, M., Gallois, J. L., Robaglia, C., Mwoury, B., Palloix, A. And Caranta, C., 2008. Natural variation and functional analyses provide evidence for coevolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *The Plant Journal* 54, s.56–68.
- Clark, M. F., Adams A. N. 1977. Characteristics of the Microplate method of enzymelinked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34: 475-483.
- Carrington, J. C. and Dougherty, W. G., 1987a. Small nuclear inclusion protein encoded by a plant potyvirus genome is a protease. *Journal of Virology* 61, 2540-2548.
- Carrington, J. C. and Dougherty, W. G., 1987b. Processing of the tobacco etch virus 49K protease requires autoproteolysis. *Virology* 160, 355-362.
- Çağlar, B. K., 2006. Hıyar Mozaik Virüsü (CMV)'nün Kavun (CMV-K), Domates (CMV-D), Biber (CMV-B) İzolatlarının Biyolojik, Serolojik, Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyonu ve Satellit-RNA'lerin Virüs Üzerindeki Etkisi. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana. 103s.
- Daplan, N., 2003. Hatay İli Biber Alanlarındaki Viral Hastalık Etmenleri ile Oranlarının Saptanması ve Farklı Biber Tiplerinin Virüslere Karşı Tepkilerinin Belirlenmesi Yüksek lisans Tezi. Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Hatay. 48s.
- Ekbiç E., Abak K. ve Yılmaz M.A. 1997. A New PVY Pathotype on Pepper Along Mediterranean Coastal Area of Turkey. Proc.10th Cong, Medit. Phytopath. Union, Montpellier, 1-5 June 1997. 187-189.

- Flor, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Ann.Rew. Phytopathology*. 9: s.275-290.
- Green S. K., Kim J. S., 1991. *Characteristics and Control of Viruses Infecting Peppers: a Literature Review*. Shanhua, Taiwan: Asian Vegetable Research and Development Center: AVRDC Technical Bulletin no. 18.
- Greenleaf W. H., 1986. *Pepper breeding*. In *Breeding Vegetable Crops*, Edited by M. J. Bessett. Westport, CT: AVI Publishing, pp: 67–134.
- Gugerli P., Gehriger, W. 1980. Enzyme-linked immunoserbent Assay (ELISA) fort he detection of potato leafroll virus and potato virus Y inpotato tubers after artificial break of dormancy. *Potato Research*. 23: 3, s.353 – 359.
- Gugerli P., Fries P., 1983. Characterization of monoclonal antibodies to potato virus Y and their use for virus detection. *J. Gen. Virol*. 64, 2471–2477.
- Güldür, M. E., Erel, Ö., Deryaoğlu, A., 2004. Tütün Mozayik Virüsü İle Enfekteli Sivri Biberlerde ( *Capsicum annuum* var. *sirenae*), Oksidatif Stres. Türkiye I. Bitki Koruma Kongresi bildirileri 8-10 Eylül 2004 Samsun. 175.
- Gümüş, M., Erkan, S., Yorgancı, Ü., Duman, İ. 2001. Bazı sebzelerin tohumlarında bulunan viral etmenlerin saptanması üzerine araştırmalar. Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, 3-8 Eylül, 2001 Tekirdağ. s190-197.
- Heiser, B. 1973. *Seed to civilization. The story of man's food*. Freeman. San Francisco/ Reading, 243s.
- Hari, V., Siegel, A., Rozek, C. and Timberlake, W. E., 1979. The RNA of tobacco etch virus contains poly(A). *Virology* 92, 568-571.
- Hari, V. 1981. The RNA of tobacco etch virus: further characterization and detection of protein linked to RNA. *Virology* 112, 391-399.
- Hellmann, G. M., Shaw, J. G., Lesnaw, J. A., Chu, L.-Y., Pirone, T. P. and Rhoads, R. E., 1980. Cell-free translation of 'tobacco vein mottling virus RNA. *Virology* 106, 207-216.

- Hobbs, H.A., Valverde, R.A., Black-L.L., Dufresne, D.J., 1996. (Resistance in a *Capsicum annuum* L.(Pepper) seven geographically diverse cucumber mosaic virus isolates. *Revista-Mexicana-de-phytopathologia*, 132-134.
- Kang B. C., Yeam I., Frantz J. D., Murphy J. F., Jahn M. M., The *pvr1* locus in *Capsicum* encodes a translation initiation factor eIF4E that interacts with Tobacco etch virus VPg. *Plant J.* 42, 392–405, (2005).
- Kyle, M., Palloix A., 1997. Proposed revision of nomenclature for potyvirus resistance genes in *Capsicum*. *Euphytica* 97, 183–188.
- Lindhout, P., 2002. The perspectives of polygenic resistance in breeding for durable disease resistance. *Euphytica*, 124, 217-226.
- Lorenzen J.H., Piche L.M., Gudmestad N.C., Meacham T., Shiel P., A multiplex PCR assay to characterize Potato virus Y isolates. *Plant Dis.* 90, 935–940, (2006).
- Moury, B., Morel, C., Johansen, E., Guilbaud, L., Souche, S., Ayme, V., Caranta, C., Palloix, A., Jacquemond, M., 2004. Mutations in potato virus Y genome-linked protein determine virulence towards recessive resistance in *Capsicum annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. *Mol.Plant Microbe Interact*: 17. s. 322-329.
- Pickersgill, B. 1997. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica*: 96 s.129-133.
- Robaglia, C., Caranta, C. 2006. Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends Plant Sci*: 11, s.40-45.
- Ruffel, S., Dussault, M.-H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C. and Caranta, C., 2002. A natural recessive resistance gene against Potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J*: 32, s.1067–1075.
- Ruffel, S., Dussault, M.-H., Duprat, A., Palloix, A., Moury, B., Revers, F. Bendahmane, A., Robaglia, C. and Caranta, C., 2004. The key role of the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) in plant-potyvirus interactions. In *Biology of Plant-Microbe Interactions*, vol. 4, s. 81–83.

- Sacristán, S. and García-Arenal, F., 2008. The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Mol. Plant Pathol.* 9, s.369–384.
- Shahabuddin, M., Shaw, J. G. and Rhoads, R. E., 1988. Mapping of the tobacco vein mottling virus VPg cistron. *Virology* 163, 635-637.
- Shifriss, C., Pilowski, M., Cohen, S., Joseph, R., Ben, H. S. 1994. First report of bellshaped peppers tolerant to cucumber mosaic virus. *Plan-Disease-Research*: 13; 2, s.125-128.
- Siaw, M. F. E., Shahabuddin, M., Ballard, S., Shaw, J. G. and Rhoads, R. E., 1985. Identification of a protein covalently linked to the 5' terminus of tobacco vein mottling virus RNA. *Virology* 142, 134-143.
- Singh, M., Sing, R.P., 1997. Potato virus Y deduction: sensitivity of RT-PCR depends on the size of fragment amplified. *Can J. Plant Pathology*, 19, s.149-155.
- Singh R.P., Reverse-transcription polymerase chain reaction for the detection of viruses from plants and aphids. *J. Virol. Methods* 74, 125–138, (1998).
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol biol evol.* 28 (10) : 2731-9.
- Yilmaz, M.A., Davis, R.F., 1984. Detection of Tobamoviruses from purified or crude extracts after agarose gel electrophoresis. *Can.J.Path.* 7:223-227.
- Weilguny H., Singh, R.P., Separation of Slovenian isolates of PVY(NTN) from the North American isolates of PVY(N) by a 3-primer PCR. *J. Virol. Methods* 71, 57–68, (1998).

## EKLER

### ELİSA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

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

Kimyasal	Miktar
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.59 g
NaHCO <sub>3</sub>	2.93 g
NaN <sub>3</sub>	0.2 g

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

#### Ek 1. Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate Buffered Saline, PBS), pH 7.4, 1000ml

Kimyasal	Miktar
NaCl	8.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g
KCl	0.2 g

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

### **Ek 1. Konjugat Tampon Çözeltisi (Enzyme Conjugate Buffer) pH 7.4 1000ml**

<b>Kimyasal</b>	<b>Miktar</b>
PBS	1 lt
PVP	20 g
Ovalbumin	% 2
Tween 20	0.5 ml

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

### **Ek 1. Yıkama Tampon Çözeltisi (Washing Buffer) pH 7.4 1000ml**

<b>Kimyasal</b>	<b>Miktar</b>
PBS	1 lt
Tween 20	0.5 ml

1 litre PBS içerisine 0.5 ml tween 20 eklenerek hazırlanmıştır.

### **Ek 1. Substrate Buffer pH 9.8 1000ml (Substrat Tampon Çözeltisi)**

<b>Kimyasal</b>	<b>Miktar</b>
Diethanolamine	97 ml
NaN <sub>3</sub>	0.2 g

800 ml saf su içerisine, 97 ml dietanolamine ve 0.2 g NaN<sub>3</sub> ilave edildikten sonra pH 9.8'e ayarlanıp, 1 litreye tamamlanmış ve 4 °C' de saklanmıştır.

# ÖZGEÇMİŞ

## Kişisel Bilgiler

Adı, soyadı : Ayşe Gül YILDIZ  
Uyruğu : T.C.  
Doğum tarihi ve yeri : 03.10.1990 / Kahramanmaraş  
Medeni hali : Evli  
Telefon : 05396562080  
e-posta : aysegul.7@windowslive.com

## Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	KSÜ / Bitki Koruma Bölümü	2016
Lisans	KSÜ / Bitki Koruma Bölümü	2013
Lise	Kahramanmaraş İbrahim Çalık Lisesi	2009

## Yabancı Dil

İngilizce

## Yayınlar

1. TÜRKİYE’DE BİBER ALANLARINDA TÛTÛN YANIKLIK VİRÛSÛ (*Tobacco Etch Virus* =TEV)’NÛN YAYGINLIK DURUMU VE HATAY İZOLATLARININ GENETİK KARAKTERİZASYONU
2. TÜRKİYE’DE BİBER ALANLARINDA YENİ POLEROVİRUS: PEPPER YELLOW VEİN VİRUS (PVYV)