

**EK-1**

**Proje No: 103O063**

**Biber (*Capsicum annuum*)’da Tütün Mozayik Virüsü (TMV), Patates Y Virüsü (PVY), ve Hıyar Mozayik Virüslerine (CMV) Dayanıklılığı Kontrol Eden Genlerin Belirlenmesi, Genetik Haritalanması ve Moleküler Islahı**

**DOÇ. DR. SAMİ DOĞANLAR  
DOÇ. DR. ANNE FRARY  
YRD. DOÇ. DR. MUSTAFA GÜMÜŞ  
EVRİM BALCI  
MEHMET ALİ KEÇELİ**

**OCAK 2008  
İZMİR**

## ÖNSÖZ

Virüsler tarımsal olarak en önemli bitki patojenleri arasında yer alırlar. Bitki viral hastalıkları çoğu üründe olduğu gibi biberde de önemli düzeylerde ekonomik kayıplara sebep olurlar. Ülkemiz ve diğer pek çok ülkede TMV, TSWV, PVY, PepMoV ve CMV başta olmak üzere bir çok viral etmen biber tarımında önemli verim ve kalite kayıplarına sebep olmakta ve hatta bazı bölgelerde biber tarımını imkansız hale getirmektedirler. Dünyada tohum ticaretinin yaygınlaşması, tohum üretiminin çok farklı ülkelerde yapılıyor olması tohumla taşınan hastalık etmenlerinin yayılma hızını da arttırmıştır. Bir çok virüs etmeninin farklı patotiplerinin olması o virüs türüne ait her patotip için farklı bir dayanıklılık geninin aktarılmasını gerektirmektedir. Dolayısıyla, günümüz biber çeşitlerinin herhangi bir piyasa değerinin olması için bu hastalık etmenlerine dayanıklılık sağlayan genlerden en az bir veya bir kaçına çoğu zaman hepsine birden sahip olması gerekmektedir. Dolayısıyla, bu projede verimi ve kalitesi yüksek yerel çeşitlere çoklu virüs hastalık etmenlerine dayanıklı sağlayan genetik faktörler moleküler teknolojilerin yardımı ile aktarılmaya çalışılmıştır.

Bu proje TÜBİTAK tarafından Doç. Dr. Sami Doğanlar'a sağlanan destekle tamamlanmıştır (TÜBİTAK 103O063).

# İÇİNDEKİLER

ÖZET	4
ABSTRACT	5
1. GİRİŞ	6
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Biber	7
2.2. Bitki Virüsleri	8
2.2.1. Hıyar Mozayik Virüsü	8
2.2.2. Patates Y Virüsü	11
2.2.3. Tütü Mozayik Virüsü	14
2.3. Moleküler Haritalama	15
2.3.1. Çoğaltılmış Parçacık Uzunluk Polimorfizmi (AFLP)	17
2.3.2. Basit Sekans Tekrarları (SSR)	18
2.3.3. Kesilmiş çoğaltılmış Polimorfizm (CAP)	19
2.4. Biber’de Virüs Dayanıklılığı Çalışmaları	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Bitkisel Materyal	21
3.2. Virüs İnokülasyonu	22
3.3. Fenotipik Karakterizasyon	23
3.4. Genotipik Karakterizasyon	25
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	28
4.1. TMV, PVY, CMV dayanıklılıklarının Türk Çeşitlerine Aktarılması	28
4.2. Kalıtım	55
4.3. Moleküler Analizler	55
4.3.1. Çoğaltılmış Parçacık Uzunluk Polimorfizmi (AFLP)	55
4.3.2. Basit Sekans Tekrarları (SSR)	60
4.3.3. COSII İşaretleyicileri	63
4.4. Kantitatif Karakter Lokus Analizler (QTL)	68
5. SONUÇLAR	69
EK-2: KAYNAKLAR	73
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU	78

## TABLO LİSTELERİ

Tablo 1. AFLP primer kombinasyonları	26
Tablo 2. AFLP analizleri için filtreleme parametreleri	27
Tablo 3. İlk TMV testleme sonuçları	29
Tablo 4. TMV dayanıklı hatlarla yapılan melez kombinasyonları	30
Tablo 5. İlk CMV testleme sonuçları	30
Tablo 6. CMV dayanıklı hatlarla yapılan melez kombinasyonları	32
Tablo 7. F <sub>8</sub> ve melez kombinasyonlarda yapılan CMV sonuçları	33
Tablo 8. CMV melez kombinasyonları	36
Tablo 9. TMV testlemelerinde kullanılan genetik materyaller	37
Tablo 10. TMV visürü ile yapılan testleme sonuçları	38
Tablo 11. İlk PVY testleme sonuçları	45
Tablo 12. CMV haritalamasında kullanılacak populasyonlar	47
Tablo 13. F <sub>2</sub> populasyonu CMV testleme sonuçları	52
Tablo 14. AFLP primer kombinasyonu/polimorfik lokuslar	60
Tablo 15. Hpms işaretleyicilerinin listesi	61
Tablo 16. COSII işaretleyicilerinin listesi	64
Tablo 17. F <sub>2</sub> populasyonu için elde edilen ki kare sonuçları	65
Tablo 18. Biber F <sub>2</sub> populasyonunda belirlenen QTL'ler	68
Tablo 19. <i>L</i> geninin patovar spesifik allelleri	71

## ŞEKİL LİSTELERİ

Şekil 1. F <sub>2</sub> , BC and RIL populasyonlarının oluşturulması	16
Şekil 2. CMV simptomları ve 1-5 skalası	23
Şekil 3. Dördüncü hafta inoküle edilmeyen yaprakların ELISA sonuçları	49
Şekil 4. Sekizinci hafta inoküle edilmeyen yaprakların ELISA sonuçları	50
Şekil 5. F <sub>3</sub> bitkilerinin görsel skorlarının dağılım histogramı	51
Şekil 6. E-ACT/M-CAG primer AFLP grafiği örneği	57
Şekil 7. Bir primer kombinasyonu için hazırlanan overlay grafiği	58
Şekil 8. E-AGG/M-CTA primeri AFLP sonuçlarının gösterildiği stacked grafiği	59
Şekil 9. Hpms işaretleyicisi jel görüntüsü	62
Şekil 10. CosII işaretleyicileri ile yapılan polimorfizm çalışması jel görüntüsü	63
Şekil 11. F <sub>2</sub> populasyonunda test edilen bir COSII örneği jel görüntüsü	67

## ÖZET

Türkiye biber üretiminde dünya’da üçüncü sırada yer almaktadır. Biber bitkisi ülkemizin hemen hemen her yöresinde salça, turşu, taze tüketim ve kurutma amaçları için yetiştirilmektedir. Virüs hastalıkları verim düşüklüklerinin yanısıra meyve kalitesinde bozukluklara sebep olmaktadır. Kalitesi düşük ürünün gerek iç ve gerekse dış pazarlarda değerlendirilmesi güçleşmektedir. Türkiye’de yetiştirilen yerel ve melez çeşitlerin hiç birinde problem olan viral hastalık etmenlerinin hepsine birden dayanıklılık mevcut değildir. Bununla birlikte, önemli bir çok virüse karşı dayanıklılık yabancı türlerde belirlenmiştir. Günümüze kadar yabancı türlerde belirlenen dayanıklılık kaynaklarının hiç biri etkili ve başarılı bir şekilde kültür türü *Capsicum annuum*’ a aktarılamamıştır. Moleküler genetik haritaların oluşturulması, dayanıklılığı kontrol eden genlerin sayısını, her bir genin dayanıklılık karakteri üzerine etkisi ve bu genlerin biber genomundaki yerlerinin belirlenmesini mümkün kılabilir. Dayanıklılığı kontrol eden genler belirlendikten sonra, bu genlerle link halinde olan moleküler işaretleyiciler kullanmak suretiyle yabancı türden belirlenen dayanıklılık genleri istenilen kültür biber çeşitlerine aktarılabilir. Önerilen bu projede, yabancı biber türleri *C. chilense* ve *C. frutescens* çok zarar verici ve geniş bir alanda dağılım gösteren üç önemli biber bitkisi virüslerine karşı test edilmiştir. Bu virüsler arasında tütün mozayik virüsü (TMV), patates Y virüsü (PVY) ve hıyar mozayik virüsü (CMV) bulunmaktadır. Bu yabancı türe ilaveten, New York-TMV ve -CMV izolatlarına karşı dayanıklı oldukları belirlenen ileri ıslah hatları da Türkiye’de mevcut viral izolatlarla test edilmiştir. Genetik haritalama popülasyonları geliştirilmiş ve bu hastalıklara dayanıklılığı sağlayan genlerle bağlantı halinde olan moleküler işaretleyiciler belirlenmiştir. Dayanıklılıkla bağlantı halinde olduğu belirlenen moleküler işaretleyiciler kullanarak dayanıklılık genleri ülkemizde yetiştirilen biber çeşitlerine aktarılmıştır.

**ANAHTAR KELİMELER:** Biber, PVY, CMV, TMV, moleküler ıslah, QTL

## **ABSTRACT**

Turkey ranks third in world production of pepper. The crop is grown throughout the country and has numerous uses: as a fresh vegetable, for paste, dried, pickled and conserved. Viruses are a major pathogen of pepper and can severely reduce the yield and quality of the crop. In turn, poor quality limits processing and export of pepper in Turkey. None of the current local or hybrid varieties grown in the country have multiple virus resistance. However, resistances to many important viruses have been identified in the wild relatives of cultivated pepper. To date, none of these resistances have been successfully transferred to *Capsicum annuum*. With the aid of molecular genetic markers and linkage maps, it is possible to determine the number of genes controlling resistance, their individual effects on the trait and their genomic locations. Once this has been done, markers that are linked to resistance can be used to expedite the transfer of the resistance genes from the wild species to cultivated pepper. In the proposed research, accessions of the wild pepper species *C. Chilense* and *C. frutescens* were screened for resistance to three of the most damaging and widespread diseases of pepper: Tobacco mosaic virus (TMV), cucumber mosaic virus (CMV) and potato virus Y (PVY). In addition to the wild species, advanced breeding lines that have been shown to be resistant to American (New York) isolates of TMV and CMV were screened for resistance to Turkish isolates of all three viruses. Mapping populations were developed and molecular markers linked to resistance loci were identified. Linked markers can be used for marker-assisted selection to transfer these resistances to Turkish pepper cultivars.

**KEYWORDS:** Pepper, PVY, CMV, TMV, Molecular Breeding, QTL

## 1. Giriş

Biber günlük diyetimizin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Dünyada yaklaşık 24 milyon ton/yıl biber üretilmektedir. Türkiye 1.85 MT ton üretimiyle Çin ve Meksika'dan sonra 3. sırada yer almaktadır (FAO, 2005). Ülkemizde örtüaltı biber üretimi 2003 yılında 300 BT ton olup, toplam biber üretiminin yaklaşık %18'lik kısmını oluşturmaktadır. Biber tarımının toplam sera sebzeçiliği içindeki payı ise %15 civarındadır. Ülkemizde biber yetiştiriciliğini verim ve kalite açısından etkileyen pek çok biyotik faktörler bulunmaktadır. Biyotik faktörler içerisinde viral hastalık etmenleri biber tarımını yetiştiriciliğinin yapıldığı her yöremizde ciddi bir şekilde etkilemektedir. Viral etmenler arasında hıyar mozayik virüsü (CMV), tütün mozayik virüsü (TMV), patates Y virüsü (PVY) ve domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV) başlıcalarını oluşturmaktadır. Verim stabilitesini ve ürün kalitesini artırması ve virüs vektörlerini kontrol etmek için daha az pestisit kullanımı gibi olumlu sonuçlarından dolayı çoklu virüs dayanıklılığı önemli bir ıslah çalışma konusudur. Son zamanlara kadar çok büyük yatırımlar yapılmasına rağmen konvansiyonel ıslah yöntemleri ile virüslere dayanıklılığı sağlayan bütün komponentleri içeren bir ıslah hattı henüz geliştirilememiştir. Bu durumun bir çok sebebi arasında en önemlisi fenotipe dayalı seleksiyonlarda istenilen düzeyde başarılı sonuçların alınamamasıdır. Dolayısıyla, en önemli biber virus hastalık etmenlerine karşı dayanıklılığı sağlayan genlerin biber genomunda haritalanması ve bu genlerle bağlantılı olan moleküler işaretleyicilerin belirlenmesi ile birlikte bu genlerin moleküler ıslahı imkan dahilinde olmuştur. CMV, PVY, TSWV, PepMoV ve TMV virus hastalık etmenlerine yönelik biber'de son zamanlarda çok sayıda haritalama çalışmaları yapılmış ve dayanıklılıkta rol oynayan genetik faktörler belirlenmiş ve bu genlerle bağlantı gösteren moleküler işaretleyiciler ortaya konmuş ve artık dünyada (kısmen de ülkemizde) rutin olarak kamu ve özel sektör biber ıslah programlarında kullanılmaya başlanmıştır.

## 2. Genel Bilgiler

### 2.1. Biber

Capsicum biberleri Solanaceae ailesi içerisinde tek bir cinse ait olan meyveli bitkilerdendir. Capsicum türleri Meksika, Güney Peru ve Bolivya'da ortaya çıkmıştır ve beş kültür türü ve bu türlere ait yüzlerce çeşit içermektedir. Bütün doğal biber populasyonları diploid olup aynı kromozom sayısına ( $2n = 24$ ) sahiptir. Günümüze kadar, en az 25 adet yabani biber türünün varlığı rapor edilmiştir. Kültüre alınmış türler arasında *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum* var. *Pendulum* and *C. pubescens* yer almaktadır (PICKERSGILL, 1997).

*C. annuum* hemen hemen dünyanın her tarafında en yaygın olarak yetiştirilen türdür ve tatlı bell tipi biber tiplerine ait biber çeşitleri kadar acı sivri biber tiplerine ait çok sayıda biber çeşitleri içermektedir. Bu tür domates ve patates gibi beyaz renkli çiçeklere sahip, küçük, dallı, otsu ve tek yıllık bir türdür. Meyveleri şekil, büyüklük ve renk bakımından oldukça farklılıklar arz etmektedir. Tam olgunlaşmamış meyveler yeşil renlidir. Olgun meyve renkleri beyaz ve mor renklerde içeren sarı ile parlak kırmızı arasında değişiklik gösterir. Meyve şekilleride değişiklik gösterir. Meyve şekilleri uzundan dar ve hemen hemen yuvarlak şekle kadar farklılık gösterir. *C. frutescens* tropic ve ılıman iklime sahip alanlarda esas olarak kültüre alınır ve genellikle daha çok fiery tada sahiptir. *C. chinense* bilimsel isminin tersine, Güney Amerika orijinlidir. Bu tür içerisinde bilinen en acı chili biberleri arasında gösterilen habanero tip biber çeşitleri yer almaktadır. *C. baccatum* çoğunlukla Orta ve Güney Amerika yüksek kesimlerinde yetiştirilen bir türdür ve *aji* olarak isimlendirilmektedir. *C. pubescens* kültüre alınmış biberler arasında en az bilinen türdür.

Türkiye'de biber üretimi sürekli bir artış (4-10% artış/yıl) göstermektedir. Bunun bir sonucu olarak, 1980 yılında 220.000 ton olan toplam biber üretimi günümüzde 1.900.000 ton seviyelerine ulaşmıştır (FAO, 2005). Biber üretiminin önemli bir kısmı (%33) Akdeniz Bölgesinin kıyı kesimlerinde yapılmaktadır. Ege, Marmara ve Karadeniz Bölgeleri üretim bakımından Akdeniz Bölgesini takip etmektedir. Biber üretimi bakımından Türkiye yıllık 1.829.000 ton (%7 si) üretim miktarıyla Çin'den sonra (12.531.000 ton üretmektedir) ikinci sırada yer almaktadır (FAO, 2005).



## **2.2. Bitki Virüsleri**

Bitki hastalıkları bitkilere ve bitki ürünlerine verim ve kalite açısından zarar verdikleri için insanlar için önemlidir. Bitki hastalıkları çiftçilere ekonomik kayıplara sebep olurlar, tüketicilerin daha fazla harcama yapmalarını sonuçlarlar ve ormanlar, parklar, cadde boyları ve evler arasındaki bitkilere zarar vererek çevre güzelliğini bozarlar. Bitkilere hastalık yapan çok sayıda hastalık etmeni bulunmaktadır. Bu etmenler arasında viral hastalık etmenleri özellikle sebze türlerine en ciddi zararları veren etmenler arasında yer almaktadırlar.

Biber üretimi farklı virüs etmenleri tarafından sınırlandırılır. Türkiye’de en yaygın görülen virüs hastalık etmenleri arasında sırasıyla, hıyar mozayik virüsü (CMV) ve patates Y virüsü (PVY) olarak gösterilmektedir (YILDIZ ve ark., 1990). Tütün mozayik virüsü (TMV) ve tütün etch virüsü (TEV) biber bitkisine zarar veren önemli virüsler arasındadır. Biber mild mottle virüsü (PMMoV) ve domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV) giderek önem kazanmaktadır.

Hıyar mozayik virüsü (CMV) verim ve kaliteyi azaltarak bitkilere önemli ekonomik zararlar verirler. Sonuç olarak, CMV aralarında hıyar, domates ve biber’inde bulunduğu çok sayıda üründe verim kayıplarından sorumludur (BRUNT ve ark., 1990; DANIELS ve CAMPBELL, 1992; DOUINE ve ark., 1979; GRUBE ve ark., 2000b; KEARNEY ve ark., 1990; SIKORA ve ark., 1998). CMV çok geniş bir konukçu ağına sahiptir ve çok sayıda sebze, süs ve diğer bitki türlerini infekte edebilmektedir (PALUKAITIS ve ark., 1992). Bazı önemli konukçu bitki türleri arasında biber, hıyar, domates ve muz yer almaktadır.

### **2.2.1. Hıyar Mozayik Virüsü (CMV)**

Hıyar Mozayik Virüsü (CMV) Bromoviridae ailesi içerisinde Cucumovirüs cinsine ait bir türdür (GALLITELLI, 2000; ROOSSINCK, 2002). CMV 29 nm genişliğinde üç kısımdan oluşan polyhedral bir virüstür. CMV parçacıkları isometrik yapıda olup bir protein kılıfı içermektedir ve tek sarmallı ve artı sense RNA genomuna sahiptir. Virüsün capsidi birbirine benzeyen 180 protein altbirimi (icosahedral symmetry) içermektedir. Virionları %18 civarında RNA içermektedir. CMV üç farklı pozitif sarmallı RNA genomuna (RNA1, 2, 3) ve ayrıca altgenomik bir RNA (RNA4) ye sahip

bulunmaktadır (ROOSSINCK, 2001). RNA1 ve 2 viral replikase enziminin komponentleridir (HAYES ve BUCK, 1990). RNA3 protein kılıfı ve virüsün bir hücreden diğerini hareketini sağlayan 3a proteinlerini kodlayan açık okuma çerçevelerine (ORF) sahiptir (DAVIS ve SYMONS, 1988). Protein kılıfı altgenomik RNA4 ten çevrilmektedir. RNA4 ise virüs ile infekte olmuş hücrelerde yer alan RNA3 ün eksi sarmalından çevrilmiştir (SCHWINGHAMER ve SYMONS, 1977; GALLITELLI, 2000). Ayrıca, son zamanlarda, 2b proteini CMV'nin bazı ırkları ile infekte edilmiş bitkilerde bulunmuştur. RNA2'nin altgenomik RNA'inden çevrilen 2b proteini konukçuya özgün uzun mesafe virüs taşınmasından (DING ve ark., 1995; GALLITELLI, 2000) ve konukçu bitkilerde gen silencing reaksiyonunu örtmesi ile ilişkili olduğu saptanmıştır (LI ve ark., 1999). Dolayısıyla, RNA1, 2, 3 konukçu bitkilerin sistemik olarak infeksiyonunda gereklidir (GALLITELLI, 2000). Ayrıca, CMV'nin bazı ırklarında virüs replikasyonunda rol oynadığı düşünülen RNA5 proteini de mevcut bulunmaktadır (GALLITELLI, 2000). Bunun yanısıra, CMV uydu (satellite – satRNA) RNA'leri içermektedir. Uydu RNA'leri infekte olmuş bitkilerin dokularında CMV birikimini azalmaktadır (GARCIA-ARENAL ve ark., 2000). CMV ırkları dizi benzerliklerine ve serolojik ilişkilerine göre üç ana alt grup içerisinde sınıflandırılırlar. Bu gruplar altgrup IA, IB ve altgrup II olarak tanımlanırlar (ROOSSINCK, 2001, 2002; GARCIA-ARENAL ve ark., 2000; GALLITELLI, 2000). IA ve IB altgrupları II altgrupundan daha çok sıklıkta ortaya çıkmaktadır (CRESCENZI ve ark., 1993; FRAILE ve ark., 1997).

CMV'nin replikasyon mekanizması diğer bitki virüslerine benzemektedir ancak halen tam olarak bilinmeyen replikasyon mekanizması ile ilgili çok sayıda özgün detaylar vardır. Bir bitki üzerinde afit beslendiği zaman hücre içerisine virüs parçacıklarını kolayca taşıyabilir. Virüs parçacıkları ayrışır ve viral RNA'ler dağılır. CMV'nin RNA1 ve 2'si viral replikasyonda yer alan viral replikase'in protein komponentlerini sentezlemek üzere sitoplazmik ribosomlarda translasyona uğrar (BARNETT ve WOOD, 1978). Bu kompleks yapı zarflara bağlanır (HAYES ve BUCK, 1990) ve daha sonra viral replikase viral RNA'lerle biraraya gelir ve viral replikasyon kompleksini oluştururlar. Replikase nükleotid dizilerini tanır ve CMV RNA'lerinin her birinde bulunan kodlama yapmayan 3' ucu bölgesinde dizileri bağlar. Viral replikase CMV RNA'lerinin her birinin (+) viral RNA sarmalını kullanarak (-) viral RNA sarmallarını sentezler. Sentezlemenin bazı noktalarında, (-) sarmalların sentezlenmesi duru ve viral

replikase (+) viral RNA sarmalını sentezler. Bu işlem konukçu faktörleri ve 1a proteinleri ile regüle edilmektedir.

Sinkronize replikasyon çalışmaları kılıf proteini sentezlenmesinin oranının viral replikasyonun başlangıç devrelerinde oldukça yavaş olduğunu ancak infeksiyon aşamasında daha baskın (dominant) hale geldiğini göstermiştir (GONDA ve SYMONS 1979). Viral protein sentezlenmesi regülasyonu muhtemelen viral kılıf proteini mRNA (RNA4) sentezlenmesi seviyesinde olmaktadır. Virion'ların oluşumu muhtemelen CMV RNA'leri ile CMV kılıf proteinleri arasındaki interaksiyonlardan ortaya çıkan doğal bir işlemdir (CHEN ve FRANCKI, 1990). CMV RNA'lerinin inoküle edilmiş yapraklar içerisindeki hareketini serbest RNA halinde veya nukleoprotein kompleksi halinde yada virüs parçacıkları halinde mi olduğu henüz bilinmemektedir. Hastalık oluşturan RNA'lerin yapraktan yaprağa taşınması virüs parçacıkları sayesinde olduğu sanılmaktadır. İnfekte olmuş hücrelerde beslenen afitler virüs parçacıklarının sitoplazma yolu ile kazanırlar ve diğer bitkilere virüsü aktarırlar.

CMV çok iyi çalışılmış bir virüsdür. Çok farklı bitki türlerini infekte edebilen ve değişik simptomlara sebep olan çok sayıda CMV ırkları mevcuttur (PALUKAITIS ve ark., 1992). CMV ısrarcı olmayan bir şekilde afitler tarafından yayılırlar. Virüs infekte olmuş yapraklarda afitler tarafından çok kısa bir sürede (beslenme sırasında bir dakikadan daha az süreçte) kazanılmaktadır ve duyarlı bir bitkiye hemen taşınabilmektedir. Duyarlı bir bitki CMV ile infekte olduğunda, böcek vektörleri ve insanlar tarafından diğer sağlıklı bitkilere bulaştırılırlar. CMV 80 den fazla farklı afit türleri tarafından taşınmaktadır (GALLITELLI, 2000). Virüs afit vektörleri içerisinde çoğalmazlar ve afitlerin gelecek döllerinde taşınmazlar. CMV taşıyan en önemli afit türleri arasında *Myzus persicae* (yeşil şeftali afiti) and *Aphis gossypii* (pamuk afiti) yer almaktadır. Bu türler aynı zamanda CMV taşınması ile ilgili denemelerde yoğunlukla kullanılmaktadır. Biber, hıyar ve kereviz gibi CMV'ye duyarlı bitkilerin tohumlarında CMV çok düşük sıklıkta yada hiç taşınmamaktadır. CMV küsküt gibi bitki paraziti bitkiler tarafında taşınabilmektedir (FRANCKI ve ark., 1979). Ayrıca, çevre şartları CMV yayılması için önemlidir (STIMMANN ve SWENSON, 1967).

Hıyar Mozayik Virüsü yaprak, çiçek ve meyvelerin beneklenmesi, renk solgunluğu ve bozukluğuna sebep olarak bitkileri etkilemektedirler. Ürünler verim ve kalite açısından

önemli kayıplara uğrarlar. CMV tarla veya sera koşullarında yetiştirilen ürünleri etkileyebilir. Genç fideler ilk bir kaç haftalık süreç içerisinde tarlada sıkça CMV enfeksiyonuna uğrarlar. Genellikle tarla enfeksiyonları bitkiler altı haftalık iken ve güçlü büyüme gösterirken olmaktadır. İnokülasyondan dört - beş gün sonra, genç gelişen yapraklar beneklenmeye, bozulmaya ve kıvrılmaya başlarlar. Yaprakların kenarları alta doğru kıvrılmaya başlarlar. İleri dönemlerinde büyüme drastik olarak azalır. Bitkiler daha kısa sap internotları ve pedioellerinin bir sonucu olarak küçülmüş görünürler. Bu tip bitkiler daha az miktarlarda çiçek ve meyve oluşturur ve bitki çalimsı bir görün kazanır. İnokülasyondan sonra bitki üzerinde oluşan meyveler soluk yeşil veya koyu yeşil alanların çevrelediği beyaz alanlar gösterirler. Ayrıca, enfeksiyon meyvelerin şekillerinin bozulmasına sebep olurlar.

CMV karşı korunma stratejileri diğer çoğu virüslerdeki gibidir. Sebze ve süs bitkilerinde hıyar mozayik virüsü dayanıklı çeşit kullanımı, virüsten arı stokların çoğaltılması, virüsle enfekte olmuş bitkilerin yok edilmesi, ürün rotasyonu ve vektör aktivitesinin ortadan kaldırılması ile esas olarak kontrol edilmektedir (GOLDBACH, 2003). CMV'ye dayanıklı çeşitler bir çok ürün için geliştirilmiştir. Seralarda transplant edilen bitkiler hıyar ve lili gibi CMV biriktiren bitkilerden izole edilmediğidir. Böceklerle karşı kimyasal ilaç uygulamaları CMV'den bitkileri koruma yollarındandır. Bununla birlikte, CMV her zaman çoğu diğer virüsler gibi etkili bir şekilde kontrol edilememektedir. Bu durumun iki sebebi vardır: (1) Pek çok ürün ve yabancı ot türü konukçu yada virüs rezervuarı olarak rol oynadıkları için, CMV'nin çok geniş bit konukça ağına sahip olması problemi karmaşık hale getirmektedir. (2) CMV'ye genetik dayanıklılık sadece bir kaç türde mevcuttur. Alternatif yaklaşım olarak, uydu RNA ve kılıf proteinlere dayalı transgenik teknolojilerin kullanımı tanıtılmıştır (BEACHY ve ark., 1990; TIEN ve WU,1991).

### **2.2.2. Patates Y Virüsü (PVY)**

Patates Y virüsü sebze tarımının yapıldığı bölgelerde önemli bir bitki patojenidir ve ürün kalite ve verimini % 80'e kadar azaltabilmektedir (HAMALAINEN ve ark., 1997). PVY Potyviridae familyası içerisinde yer alan Potyvirus grubuna ait (WEILGUNY ve SINGH, 1998) tek iplikli ve pozitif polariteli bir RNA virüsüdür (JACQUOT ve ark., 2005).

Bitki virüsleri şekil ve yapı bakımından değişiklik gösterebilirler. PVY ipliksi sarmal yapıda olup %5,4–6,4 nükleik asit ve %93,6–94,6 protein içermektedir. Genomu tek parçalı olup 10,4 kb uzunluğundadır. Virüs 740 nm uzunluğunda ve 11 nm genişliğindedir (BOONHAM ve BARKER,1998). PVY genomu yaklaşık olarak 9700 bazlık RNA'dan oluşmaktadır ve bu RNA'nın 3' ucundaki, kılıf proteini kodlayan bölgenin aminoasit yada nükleotid dizisini içeren ve 3' ucuna çevrilmeyen bölgenin nükleotid sekansını içeren baz dizisi, türlerin ayırımında kullanılmaktadır. Genomun 5' ucundaki sekans daha büyüktür ve bu sekansta suşların ayırımında kullanılmaktadır (SPETZ ve ark., 2003).

PVY tarafından oluşturulan hastalık “patates damar bantlaşması mozaik” veya “şiddetli mozaik” hastalığı olarak bilinmektedir. Doğada üç suşu mevcuttur. PVY<sup>O</sup>, ortak suş olarak bilinmektedir ve patatesin yetiştirildiği her yerde görülmektedir. İlk kez SMITH (1931) tarafından tanımlanmıştır. Mozaik, yaprak dökümü, yaprak ve gövde nekrozu ve tütün bitkilerinde ise hafif mozaikler şeklinde semptomlar göstermektedir. PVY<sup>N</sup>, nekrotik suş olarak bilinmektedir ve ilk kez 1950'lerde bulunmuştur. Bu suş, patates bitkilerinde hafif mozaik ya da hiç bir semptomu neden olmazken tütünde yaprak ölümü ve damar nekrozuna neden olmaktadır (SINGH,1992). PVY<sup>N</sup> suşu dünya çapında dağılmıştır ve ilk kez 1990 yılında Kuzey Amerika'da izole edilmiştir. PVY<sup>C</sup>, çizgi suşu olarak bilinmektedir ve ilk kez 1984 yılında tanımlanmıştır (BECZNER ve ark., 1984). Patates yapraklarında klorotik mozaik ve yumrulara nekrotik halkalar şeklinde semptomlar gösterir.

PVY genel olarak, aralarında Solanaceae, Chenopodiaceae, Amaranthaceae, Compositae, Leguminosae gibi ekonomik öneme sahip ürünler başta olmak üzere 27 familya içerisinde yer alan 69 cinsin 342 türünden fazlasını hastalandırabildiği saptanmıştır (BOONHAM ve BARKER,1998). *Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*, *Chenopodium quinoa*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotina tabacum*, *Solanum tuberosum*, *Tinantia erecta* PVY'nin hassas konukçu türlerine örneklerdir.

Doğada hastalığın vektörü Aphid (yaprak biti)'dir. PVY, 73 farklı aphid türü ile bütün dünyaya yayılmıştır (VARVERI, 2000). En önemli vektörleri *Myzus persicae*, *Aphis nasturti*, *Myzus certus*, *Aphis fabae*, *Rhopalosiphum insertum* ve *Macrosiphum euphorbiae*'dir. PVY vektör ile kalıcı olmayan (non-persistent) şekilde taşınır

(VARVERI, 2000). Aphid, hastalıklı bitkide beslenmeye başladıktan bir kaç saniye içinde virüsü bünyesine alır ve hemen nakleder. Konukçu bitkide inkübasyon süresi 5–15 gündür. Virüsün tarlada yayılmasındaki en önemli etken afitlerdir.

PVY'nin replikasyonu sırasında, virüs mekaniksel olarak ya da vektörler tarafından yaralandırılmış hücre duvarından geçer ve doğrudan penetrasyon yolu ile tümüyle sitoplazmaya aktarılır (WHITHAM ve WANG, 2004). Kapsid enzimler tarafından parçalanır ve viral ürün hücre sitoplazmasında sentezlenmeye başlar. Pozitif polariteli, tek iplikli PVY, parental RNA'yı mRNA olarak kullanır ve pozitif iplikçik direk olarak proteine çevrilir. Çevrilen protein oldukça büyüktür ve fonksiyonel olabilmesi için proteazlarca parçalanması gerekmektedir. Sentez edilen proteinlerden biri ise RNA polimeraz'dır. RNA polimeraz, pozitif RNA'yı kalıp olarak kullanarak komplementer negatif RNA sentez eder ve çift iplikli RNA oluşturmuş olur. Negatif iplikçik kalıp olarak kullanılarak yeni pozitif iplikçikler sentez edilir. Tüm partikülün birleşmesi sitoplazmada gerçekleşir. İlk olarak boş kapsid oluşur daha sonra viral nükleik asit kapsid içinde paketlenir. Olgunlaşan virüs, hücrenin otolizisi ile salınır (AGRIOS,1997). PVY, tarla ve seralarda çok kolay yayılır ve en büyük bulaşma etmeni Aphid'lerdir. Bulaşmayı önlemek için belirli periyotlarla böcek ilaçları kullanılmalıdır. Kullanılan alet ve donanımın temiz ve steril olmasına dikkat edilmelidir. PVY konukçuları olan patates, domates, patlıcan ve biber ekim alanları arasında mesafeler olmalıdır. PVY ile enfekte edilmiş bitkiler görüldüğü anda yakılarak yok edilmelidir.

PVY'nin birçok suşu domates, biber ve tütünde hafif beneklenmelere neden olmaktadır. PVY enfeksiyonu tütün bitkisinin verimini %30'a kadar azaltabilir. Tütün damar nekrozu hastalığına neden olan PVY<sup>N</sup> suşu, ürünün tamamen kaybına neden olur. Biber ve domateste de önemli hasar ve kayıplara neden olur. PVY<sup>N</sup>, patates yumrusunda halkasal nekrotik lekelere neden olmaktadır (MEHLE ve ark., 2004). Eğer bitki diğer virüslerin de enfeksiyonuna uğrarsa hasar çok daha yok edici olur. PVY-PVX aynı anda enfeksiyona neden olduklarında yapraklardaki kıvrıkcıklaşma ve damar nekrozu çok daha şiddetli olur.

Hastalığın semptomları virüsün suşuna, çeşitlerin hassasiyetine, enfeksiyon zamanındaki bitkinin yaşına ve çevre koşullarına bağlıdır. Hastalığın belirtileri olan mozaik ve beneklenme sıcaklık 38°C'nin üzerine çıktığı zaman maskelenebilir. Genel

olarak, nekroz, kıvrıkcıklaşma, sararma, yaprak dökümü ve erken ölüm hastalık belirtileridir. Hastalığın ilk belirtileri düzensiz mozaik ve koyu lekeler şeklindedir. Hastalığın ileri safhalarında tepedeki yapraklarda kıvrıkcıklaşma oluşur. Yaprak kırçilli olur ve dokunulduğunda kolaylıkla sapa bağlı olduğu yerden kopar. Alt yapraklar ise nekrotikleşip gövdeye yapışır. Büyümede geri kalma olduğu gibi yumru bağlama da azalır.

Hasta yumrudan gelen bitkide ilk belirtiler kıvrıkcıklaşma ve mozaikleşmedir. Daha sonra yaprak alt damarları boyunca kahverengi beneklenmeler görülür ve ileri safhalarda benekler siyah çizgi görünümünü alır. Bazı çeşitlerde ise yapraklarda nekrotik lekeler ve benekler oluşur. Bitkilerde bodurlaşma meydana gelir. Geç enfeksiyonlar bitkide yüksek hasarlara sebep olmaz; geç enfeksiyonlar semptom göstermez ya da çok hafif semptom gösterirler. Virüs, tohuma yerleşmez ve tohum ile aktarılamaz. PVY, meyvede semptomlar oluşturmaz.

### **2.2.3. Tütün Mozayik Virüsü (TMV)**

TMV ürün kayıplarına sebep olan, dokuz bitki ailesine ait aralarında tütün, domates, biber, hıyar ve çok sayıda süs bitkisinde bulunduğu en az 125 bitki türünü kolayca mekanik olarak infekte edebilmektedir (ZAITLIN ve ISRAEL, 1975). Tobamovirüs grubuna ait olan TMV bir RNA virüsüdür ve spiral olarak kıvrılmış ssRNA'lerden meydana gelmiştir. 300 <sup>0</sup>A uzunlukta ve 150 <sup>0</sup>A genişlikte uzun çubuk şeklinde parçacıklar halinde bulunmaktadır. Virüs kapsidini dışardan saran bir zarfı yoktur. Konukçuyu infekte ettiğinde bitki hücreleri içerisinde girer ve orada replike olur. Virüs RNA'leri proteinlerinin konukçu mekanizması tarafından sentezlenmesini yönetirler. RNA ve protein üretildikten sonra, kendi kendilerini biraraya getirirler. Capsomer ve RNA'lerin biraraya getirilmesinden sonra konukçu hücrelerinin parçalanmasını takiben hücre dışına atılırlar (KLUG, 1999).

TMV enfeksiyonunun simptomları az çok diğer virüslerinkine benzemektedir. Yapraklar beneklenir ve bozulur. Bitkiler cüceleşir. Meyveler beneklenir ve şekli bozulur. Sistemik enfeksiyon bir çok virüs patovarı ve bitki kombinasyonlarından oluşur. Bu durumda, bitkiler solgunlaşır, sararma gösterir ve sonunda ölür. TMV taşınması için vektör gerekli değildir. TMV elle veya mekanik yollarla kolayca taşınabilir ve kötü hava şartlarına oldukça dayanıklıdır. Bitki atıklarında kuru

toprakta 2 yıl, nemli toprakta 1 ay veya kök parçalarında 22 ay canlı ve virüent kalabilirler. Sera demiri veya camı gibi ortamlarda bile uzun süre yeniden bulaşma kaynağı olarak durabilmektedirler. Bulaşık topraklara dikilen sağlıklı fideler kökte oluşan küçük yaralardan bile virüs hastalığına kolayca yakalanabilirler. Tohumların tri-sodyum-fosfat solüsyonundan geçirilmesi, sağlıklı tohum kullanılması, münavebe uygulanması, domates, patlıcan ve hıyarın ardından aynı araziye biber dikilmemesi gibi koruyucu önlemler önerilmiştir. Ancak, önerilen bu kültürel uygulamaların hiç birisi etkili bir çözüm yolu olamamıştır.

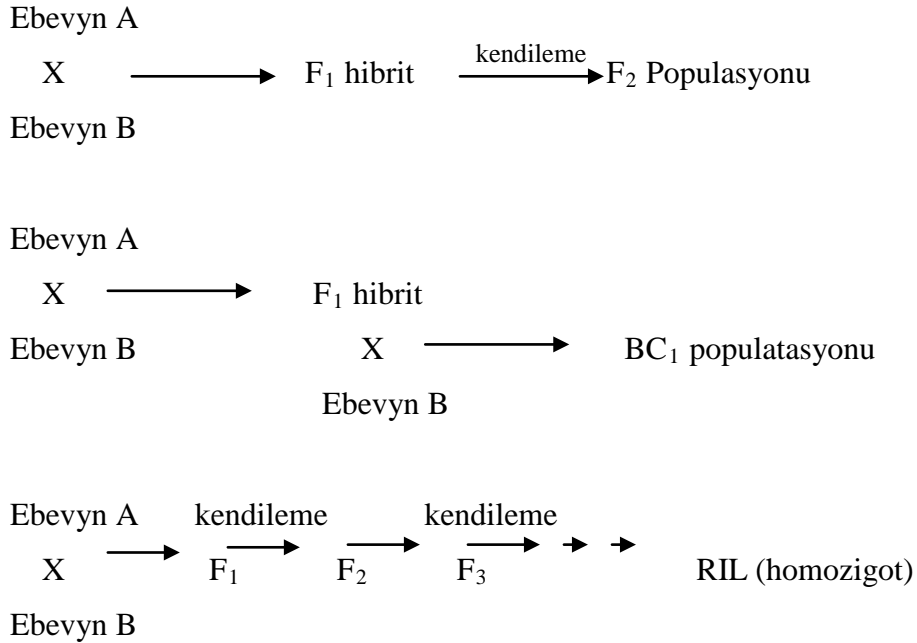
### **2.3. Moleküler Haritalama**

Moleküler haritalama kompleks genetik kontrolü olan karakterleri çalışmak ve anlamak için ümitvar bir stratejidir. Hastalığa dayanıklılık, genotiplerin çevreyle ilişkileri ve patojenlerin virülensliklerindeki farklılıklardan dolayı, çalışması zordur (YOUNG,1996). Üzerinde çalışılan karakterlerle ilişkili olan genomik bölgelerin belirlenmesi amacıyla yapılan moleküler haritalama çalışmaları hastalıklara dayanıklılığın tespit edilmesinde yardımcı olabilmektedir. Bitkilerde dayanıklılık kalitatif veya kantitatif karakter olarak kontrol edilmektedir. Kalitatif bir karakter, major bir fenotipik etkiye sahip olan ve tek bir gen tarafından kontrol edilen karakterdir ve Mendel oranlarına göre açılım gösterirler. Monogenik bir karakterdir. Örneğin, bitkilerde bazı tip hastalığa dayanıklılıklar, bezelyede çiçek rengi ve Drosophila'da göz rengi monogenik karakterlerdir. Bu tip karakterler farklı (discrete) fenotipik varyasyona sahiptirler. Kalitatif bir karakterin tersine, kantitatif bir karakter çevre koşullarının önemli miktarda etkilediği birden çok sayıda genler tarafından kontrol edilen polygenik bir karakterdir ve devamlı (continuous) açılıma sahiptir. Bu tip poligenik karakterler Mendel oranlarına göre açılım göstermezler. Örneğin, bitki yüksekliği, verim, kalite ve tuz toleransı kantitatif karakterlerdir. Kantitatif karakterler kantitatif karakter lokusları (QTL = Quantitative Trait Loci) tarafından kontrol edilmektedir. Bir kantitatif karakter lokusu devamlı açılım gösteren bir karakteri etkileyen gen(ler)i içeren kromozom bölgeleridir.

QTL haritalaması için bir kaç şart bulunmaktadır. Bu şartlar arasında: (1) moleküler işaretleyicilerin ve üzerinde çalışılan karakterlerin açılım gösterdiği geniş ve uygun bir haritalama popülasyonu; (2) kodominant işaretleyicilerden oluşan bir bütün genetik bağlantı haritası; (3) işaretleyici ve karakter allelleri arasında bağlantı disequilibriumu;



(4) kantitatif karakterleri ölçebilecek güvenilir bir metod; (5) işaretleyici ve karakterler arasındaki önemli ilişkileri ortaya koyabilecek istatistik metodu, yer almaktadır (EDWARDS ve PAGE, 1994; EDWARDS ve ark., 1987; LANDE ve THOMPSON,1990). QTL haritalamasında haritalama populasyonları çok önemlidir. Bu populasyonlar arasında  $F_2$ , gerimelez (BC) populasyonları, rekombinant saf döl hatları (RIL) ve çift haplodirler (DH) yer almaktadır (Şekil 1).  $F_2$  populasyonunun geliştirilmesi kolaydır. Haritalama çalışmalarında önemli bir parametre olan çok sayıda rekombinasyon olayı elde edilir. Bir  $F_2$  populasyonunda bütün muhtemel genotipler (AA, Aa, aa) mümkündür. Böylece gen aksiyonları dominant/resesif veya aditif şeklinde tahmin edilebilmektedir. Geri melez populasyonlarında ıslah ve gen transferi için iyi populasyonlardır ve geliştirmesi kolaydır. Ancak, bu populasyonlarda, bütün genotipler (sadece AA, Aa) mümkün olmadığı için resesif QTL'leri belirlemek imkansızdır. Rekombinant safdöl hatlarını geliştirmek uzun zaman gerektirdiği için zordur ancak  $F_2$  populasyonlarında görüldenden daha fazla sayıda rekombinasyon olduğu için önemli avantajlara sahip populasyondur. Çoğu bitkilerde çift haploid oluşturmak çok zordur veya çoğu zaman imkansızdır. Çift haploid hatların dezavantajı bütün genotipler (sadece AA, aa) mümkün olmadığı için bu populasyonlarda gen aksiyonunu belirlemek mümkün değildir.



Şekil 1. Haritalama çalışmaları için  $F_2$ , BC and RIL populasyonlarının oluşturulması

Hastalığa dayanıklılıkta rol oynayan genlerin haritalanması için fenotipik analizler (örneğin ELISA değerleri veya hastalık gözlem skorları), işaretleyici analizleri ve istatistikî analizler işaretleyici (genotip) ve dayanıklılık (fenotip) arasındaki önemli ilişkileri oluşturmak için kullanılmıştır. Fenotipik ortalama ve işaretleyici genotipi arasındaki ilişki hastalığı kontrol eden genleri haritalamada yardımcı olacaktır. Populasyonu işaretleyici genotiplerine (AA, Aa, aa) bağılı olarak gruplara ayırdıktan ve her bir genotipik sınıf için fenotipik ortalamaları belirledikten sonra ortalamalar arasında bir farklılık olup olmadığını görmek için ANOVA benzeri kıyaslamalı bir istatistikî test yapılmalıdır. Böylece, işaretleyici ile bağılantılı olan üzerinde çalışılan karakter için bir QTL olduğu sonucu varılabilmektedir. QTL analizleri üzerinde çalışılan karakteri kontrol eden gen sayısını, her bir QTL'in toplam fenotipe olan etkisi, gen aksiyonunu (dominant/resesif, aditif, overdominant) ve QTL x çevre ilişkilerini belirlemeye yardımcı olmaktadır.

Haritalama çalışmalarında kullanılan moleküler işaretleyiciler morfolojik ve moleküler işaretleyiciler olmak üzere esas olarak iki grup içerisinde sınıflandırılırlar. Morfolojik işaretleyiciler görünen bir fenotipik değişikliği kodlayan genlerdir. Cücelik veya antoksiyanin üretimi morfolojik işaretleyicilere örnektir. Morfolojik işaretleyicilerin çoğu dominant veya resesif alleller olarak açılım gösterirler. Moleküler işaretleyiciler protein, gene veya DNA seviyesinde farklılık gösterirler. AFLP, SSR, CAP, RFLP, RAPD işaretleyicileri moleküler işaretleyicilerdir. Bunlar arasında AFLP, SSR ve CAPs PCR'a dayalı işaretleyicilerdir.

### **2.3.1. Çoğaltılmış Parçacık Uzunluk Polimorfizmi (AFLP)**

AFLP genetik işaretleyici teknolojileri içerisinde en son geliştirilen teknolojilerden birisidir (VOS ve ark., 1995). AFLP işaretleyicilerini kullanmanın avantajı herhangi bir sekanz bilgisine ihtiyaç duymamasıdır. Multipleks oranı yüksektir, daha az primer kombinasyonu gerektirir ve tekrarlanabilirliği oldukça yüksektir (BREYNE, 1999; VOS ve ark., 1995; BECKER ve ark., 1995). AFLP'ler üzerinde çalışılan genomun kompleks yapılarına ve işlem içerisinde bir kaç adımın değiştirilmesi ile düzenlenebilmektedir. Özellikle çok büyük genoma sahip organizmalarda başarılı olduğu ispatlanmıştır (HAN ve ark., 1999). AFLP işaretleyicileri genetik bağlantı haritalarının oluşturulması, özgün genomik bölgelerde daha fazla işaretleyici ile

çözünürlüğün arttırılmasında, genetik çeşitlilik analizlerinde ve en önemlisi çeşitler arasındaki benzerliğin saptanması gibi oldukça geniş uygulama alanları vardır

AFLP'ler seçici PCR sonrası farklı uzunlukta parçacık polimorfizmine dayalıdır. Adaptör – homolog primerler kullanılarak yapılan PCR'ı takiben enzimle kesilmiş parçacıkların uçlarına adaptörler eklenir. Bu şekilde yüzlerce parçacık PCR ile çoğaltılabilmektedir. PCR ile elde edilen amplifikasyon ürünlerinin sayısını azaltmak için, primer seçiciliği Primerin 3'- ucuna tesadüf nükleotidlerin eklenmesiyle arttırılabilmektedir. PCR ürünü ampikonlar bozulabilir polyacrylamide sekans jelinde veya DNA dizi analiz sistemleri ile kapillar olarak bir baz çiftine kadar ayrıştırılabilmektedir. AFLP analizi ile çok az masrafla aynı anda binlerce bağımsız lokusu belirleme kapasitesi vardır. AFLP primerleri laboratuvarlar arasında primer dizilerinin yayınlanması ile kolaylıkla paylaşılmaktadır. Bütün bu özgün özellikleri AFLP analizini bitki türleri içerisinde genetik polimorfizm çalışmalarında mükemmel bir sistem yapmaktadır.

AFLP sistemi biberde bir çok moleküler genetik bağlantı haritasının oluşturulmasında kullanılmıştır. LIVINGSTONE ve ark., (1999) *C. chinense* x *C. annuum* populasyonu için bir AFLP/RFLP haritası oluşturmuştur. Bu iki sistemin entegrasyonu ile oluşturulmuş bir harita 1000 den fazla işaretleyici içermektedir ve domates ve biber türleri arasında genom kıyaslamaları yapılmasına imkan sağlamıştır. Benzeri bir türlerarası populasyon kullanarak, KANG ve ark., (2001) yaklaşık 600 işaretleyici içeren bir AFLP/RFLP bağlantı haritası oluşturmuştur. Ayrıca, AFLP'ye dayalı haritalar türleriçi melezlemelerden geliştirilmiş populasyonlar içinde oluşturulmuştur (BEN CHAIM ve ark., 2001b; LEFEBVRE ve ark., 2002). PARAN ve ark. (2004) değişik populasyonlar kullanılarak hazırlanan altı adet bağlantı haritasını kullanarak tek bir entegre biber bağlantı haritası oluşturmuştur.

### **2.3.2. Basit Sekans Tekrarları (SSRs) – Microsatellites**

Diğer bir ümitvar teknik basit dizi tekrarları olarak bilinen mikrosatellite işaretleyici (SSR) analizleridir. Bu işaretleyiciler kısa, birbiri ardına tekrarlardan oluşan DNA dizileridir. Tekrar birimlerinin sayısı mayoz bölünme sırasında replikasyon kayması ve eşit olmayan crossover'dan dolayı bireyler arasında ortaya çıkan farklılığı arz etmektedir. Genomlarda çok miktarda bulunması ve kolaylıkla saptanabilmesi, yüksek

düzye polimorfizm seviyesine sahip olması ve otomatik sistemlerle kolaylıkla belirlenmesinden dolayı, SSR'lar moleküler genetik analizler için özellikle faydalıdır (RAFALSKY ve TINGEY, 1993). SSR'lar normalde genomların kodlama yapmayan bölgelerinde oluşurlar (<http://www.sgn.cornell.edu/markers/microsats.pl>).

Mikrosatellit'ler AFLP'lerde bulunduğu kadar yüksek düzeylerde multipleks oranına sahip değildir ve primer dizayn etmek için ön sekanz bilgilerinin bulunması gereklidir. SSR'lar kodominant işaretleyicilerdir ve bilinen diğer bütün işaretleyici sistemlerine göre daha yüksek düzeylerde polimorfizm göstermektedirler (BOWERS ve ark., 1996). Bu yüksek derece polimorfizm sebebi analiz edilen bölgenin tekrar motifleri olması ve böylece replikasyon sırasında DNA polimerizasyonunun kaymasından dolayı ortaya çıkan uzunluktaki değişikliğe duyarlı olmasındandır. Gen kodlayan bölgeleri içermedikleri için, SSR'lar genellikle seleksiyon baskısı ile karşı karşıya kalmamıştır. Bundan dolayı, genomların bu alanlarının modifikasyonu organizmalara ölümcül değildir ve bu nedenle miktarları oldukça fazladır. Bu durum bu işaretleyicileri birbiri ile çok yakın ilişkili olan bireyleri (çeşitleri) ayırt etmek için iyi bir sitem yapmaktadır. Primer'ler tekrarları iki tarafından çevreleyen sekanzlerden geliştirilmektedir. Bireylerin tekrar motifleri arasındaki uzunluk farklılıkları PCR amplifikasyonu ile ortaya konulmaktadır.

AFLP gibi, SSR işaretleyicileride biber genom haritası oluşturulmasında kullanılmıştır. LEE ve KIM (2003) geliştirdikleri 46 adet SSR işaretleyicisini KANG ve ark. (2001) tarafından geliştirilen AFLP/RFLP haritasına eklemiştir. İlave SSR işaretleyicileri LEE ve ark. (2004) ve YI ve ark. (2006) tarafından geliştirilmiştir. Toplam olarak 226 SSR işaretleyicisi *C. annuum-C. chinense* F<sub>2</sub> populasyonunda haritalanmıştır.

### **2.3.3. Kesilmiş Çoğaltılmış Polimorfik Sekanslar (CAPs)**

CAP'ler RFLP işaretleyicilerine analog olan kodominant işaretleyicilerdir. COSII işaretleyicileri Asterid türlerinde tek kopya korunmuş ortolog genlerinden geliştirilmiş bir tip CAP işaretleyici sistemidir ([http://www.sgn.cornell.edu/markers/cosii\\_markers](http://www.sgn.cornell.edu/markers/cosii_markers)). CAP işaretleyici analizlerinde, bir allele özgün bir kesim kısmı içeren DNA bölgesi PCR ile çoğaltılır ve uygun bir restriksiyon enzimi ile kesilir. Bu teknikte, Gen bankasından belirlenen veya cDNA klonlarından veya genomik DNA'dan oluşturulan sekanz spesifik primerler ile çoğaltılmaktadır. PCR ile çoğaltılmasından sonra, DNA

parçacıkları uygun bir restriksiyon enzimi ile kesilir ve kesilmiş ürünler 1 X TBE tampon çözeltisi içerisinde hazırlanan 2-4%'lik agaroze jelde ayrıştırılır. Bu ayrıştırmanın bir sonucu olarak farklı uzunluktaki bantlara göre bireyler arasındaki polimorfizm saptanmaktadır.

Her işaretleyici sistemi birbirleriyle kıyaslandıklarında bazı avantaj ve dezavantajları vardır. AFLP, SSR ve CAP'ler yüksek derecede tekrar üretilebilmektedir. AFLP ve SSR sistemleri çok polimorfi işaretleyicilerdir. MILBOURNE ve ark. (1998) patates'te SSR ların AFLP'den daha polimorfik olduğunu belirlemişlerdir. MCGREGOR ve ark. (2000) ise aynı bitkide tam tersi bir sonuç elde etmişlerdir. SSR ve CosII'lar kodominant olarak skorlanırken AFLP işaretleyicileri genellikle dominant olarak skorlanmaktadır. AFLP ve CosII işaretleyici analizleri için yüksek kalite DNA'ya gereksinim vardır. AFLP için değil ancak CosII ve SSR'lar için ön dizi bilgisine ihtiyaç bulunmaktadır. Biber için CosII sistemine dayalı bir moleküler genetik bağlantı haritası halen oluşturma aşamasındadır (STEVEN TANKSLEY, kişisel iletişim).

#### **2.4. Biberde virüs dayanıklılığı haritalaması ile ilgili önceki çalışmalar**

Virüs, bakteri, nematod, fungus ve böcek dayanıklılığında rol oynayan çok sayıda tek gen veya kantitatif karakter lokusları değişik Solanaceae türlerinde haritalanmıştır (PILLEN ve ark. 1996). Akriba türlerde yapılan haritalama çalışmaları aynı genlerin farklı konukçularda aynı patogenlere karşı dayanıklılık sağlayıp sağlamadıklarının anlaşılmasına yardımcı olur. Son on beş yıl içerisinde, farklı Capsicum türleri için çok sayıda genetik bağlantı haritası yayınlanmıştır. Bu haritaların çoğu *C. annuum* x *C. chinense* arasında yapılan türlerarası melezlemelerden yada *C. annuum* türü içerisinde yapılan türleriçi melezlemelerden geliştirilen F<sub>2</sub>, BC<sub>1</sub> veya çifthaploid populasyonlar kullanılarak oluşturulmuşlardır. İlk biber genetik bağlantı haritasında, 14 adet isozyme işaretleyicisi *C. annuum* and *C. chinense* populasyonunda haritalanmıştır (TANKSLEY ve ark. 1984). Bu haritada, dokuz işaretleyici dört bağlantı grubunda (kromozom) yerleştirilmiştir. Daha sonraki haritalarda, RFLP, RAPD, SSR ve AFLP işaretleyicileri kullanılmıştır. LIVINGSTONE ve ark. (1999) *C. annuum* x *C. chinense* melezlemesinden geliştirilen bir F<sub>2</sub> populasyonunda şu ana kadar oluşturulan en kapsamlı biber- domates kıyaslamalı genom haritasını oluşturmuştur. Bu haritada 1000 üzerinde işaretleyici 3 bağlantı grubu içerisine yerleştirilmiştir. CARANTA ve ark. (2002) *C. annuum* "Vania" (CMV dayanıklı) ve *C. annuum* "H3" (CMV duyarlı)

arasında yaptıkları melezleme çalışmasından elde ettikleri F<sub>1</sub>'lerden 101 adet çifhaploid hattı CMV dayanıklılığı ve işaretleyici geliştirilmesi için analiz etmişlerdir. Bu populasyonda, toplam 184 adet işaretleyiciyi (93 AFLP, 51 RFLP, 38 RAPD ve 2 morfolojik) 20 bağlantı grubu içerisinde haritalamışlardır. LEE ve ark. (2004) *C. annuum* "TF68" ve *C. chinense* "Habanero" arasında yapılan türlerarası melezlemesinde geliştirilen 107 adet F<sub>2</sub> populasyonu kullanarak 46 adet SSR işaretleyicisini biber genomunda haritalamıştır. İlaveten, aynı populasyonda 146 adet RFLP işaretleyicisi haritalanmıştır. MINAMIYAMA ve ark. (2006) *C. annuum* "Manganji" x *C. annuum* "Tongari" melezlemesinden geliştirilen 117 adet çifhaploid kullanarak 123 SSR, 228 AFLP, 60 RAPD ve 1 CAP işaretleyicisini içeren bir bağlantı haritası oluşturmuştur.

Hastalıklara dayanıklılık lokuslarının belirlenmesi ve haritalanması bu lokusların haritaya dayalı klonlama çalışmalarında ilk adımı oluşturmakta ve ayrıca işaretleyiciye dayalı seleksiyon çalışmalarında kullanılmasına imkan sağlamaktadır. Örneğin, *Phytophthora capsici* (LEFEBVRE ve PALLOIX, 1996), PVY (CARANTA ve ark. 1997b) ve CMV (CARANTA ve ark. 1997a) dayanıklılığı sağlayan QTL'ler belirlenmiş ve biber genomunda haritalanmıştır. CARANTA ve ark. (1997a) 138 işaretleyici kullanarak yaptıkları çalışmada üç genomik bölgenin biberde CMV dayanıklılığında rol oynadığını belirlemişlerdir. GRUBE ve ark. (2000a) hastalıklara dayanıklılıkta rol oynayan genlerin genomik pozisyonlarını ve domates, biber ve patates de bu genlerin homologlarını çalışmıştır.

### **3. Gereç ve Yöntem**

#### **3.1. Bitkisel Materyaller**

Bu projede kullanılan F<sub>8</sub> ileri ıslah hatları Cornell Üniversitesi'nden sağlanmıştır. Bu materyal, dayanıklı bir yabani türle (*Capsicum frutescens*) yapılan türlerarası melezleme çalışmalarından türetilmiştir. Elde edilen F<sub>1</sub> melezler TMV ve CMV izolatlarına karşı test edilmiş ve dayanıklı bulunanlar sekiz generasyon kendilenmek ve her bir generasyonda bu iki virüs izolatlarıyla test edilmek suretiyle bu iki hastalığa karşı dayanıklı ileri ıslah hatları geliştirilmiştir (Prof. RICHARD ROBINSON, kişisel iletişim). Bu hatları sekiz generasyon kendilemenin nedeni dayanıklılıkta rol oynayan genleri homozigot hale getirmektir. Duyarlı kontrol olarak, ülkemizin değişik

yörelere yetiştirilen (Bağcı Çarliston, Sera Demre, Dolmalık) ve diğere bazı uluslararası çalışmalarda dayanıksız çeşit olarak kullanılan bazı standart hatlarda (California Wonder) çalışmaya eklenmiştir. Yabancı türler ve kültür çeşitlerine ait tohumlar Menemen-İzmir, Hollanda ve Amerika'daki gen bankalarından temin edilmiştir. F<sub>8</sub> hatları Cornell University araştırmacılarından Prof. RICHARD ROBINSON, CMV dayanıklı orijinal yabancı tür *Capsicum frutescens* yine Cornell University araştırmacılarından Prof. MOLLY JAHN'dan temin edilmiştir.

### 3.2. Virüs inokülasyonu

Bu çalışmada, genetik materyal olarak kullanılan bütün tohumlar öncelikle 2x2 viyollerde çimlendirilmişlerdir. Çimlenmeden iki hafta sonra fideler daha iyi büyüme için 10 cm. 'lik saksılara aktarılmışlardır. Saksılar iklim odası içerisinde tamamen tesadüf olarak yerleştirilmiş ve deneme boyunca 16 saat ışık ve 22 °C sıcaklık olacak şekilde tutulmuşlardır. Bitkiler dört yapraklı devreye geldiklerinde virüslerle inoküle edilmiştir (CELEBI TOPRAK ve ark. 2003). TMV, PVY veya CMV inoküle edilmiş tütün, patates veya domates dondurulmuş yaprakları inokulum kaynağı olarak kullanılmıştır. CMV-Fny inokulumu Prof. PETER PALUKAITIS (Dept. Virology, Scottish Crop Research Institute), TMV inokulum kaynağı Dr. MUSTAFA GÜMÜŞ (Ege Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü) ve PVY inokulum kaynağı olarak PVY<sup>0</sup> suşu kullanılmış ve Dr. CAROL CARANTA (INRA – Fransa) tarafından sağlanmıştır. Bütün inokulum kaynakları mekanik inokülasyon tekniğı kullanılarak tütün, patates veya domates bitkisinde çoğaltılmış ve sürekli inokulum kaynağı olarak -80 °C derin donduru içerisinde tutulmuştur.

Biber fideleri 4–5 yapraklı devrede TMV, PVY ve CMV virüsleri ile aynı şekilde mekanik olarak inoküle edilmiştir. İnokülasyonlardan bir gün önce ve bir gün sonra bitkiler masaların altına alınıp, gazete kâğıtlarıyla çevrilerek gölgede bırakılmıştır. İnokülasyonlar öğleden sonra yapılmıştır. Virüs inokulum kaynağı olarak çoğaltılmış olan patates, tütün veya domates yaprakları toplanıp, havan-havaneli yardımıyla iyice ezilerek bitki özsuvarı alınmıştır. Alınan bitki özsuvarı fosfat tamponu kullanılarak 1:10 oranında seyreltilmiştir. Fosfat tamponu, 1L distile su içerisinde 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-susuz çözülerek pH7,4'e ayarlanıp kullanılmıştır. Seyreltme yapılırken fosfat tamponunun +4°C olmasına dikkat edilmiştir. Seyreltilmiş inokulum kaynağı buz üzerine konularak inokülasyonlar yapılmıştır. İnokülasyondan önce,

karşılıklı seçilen üç yaprak yüzeyine hafifçe carborundum serpilmiştir. Pamuklu çubuk ile yaprak yüzeyine inokulum kaynağı iyice sürülmüş ve karşılıklı küçük iki delik açılarak işaretlenmiştir. Negatif kontrol olarak iki tütün ve iki biber bitkisi sadece fosfat tamponu ile inokule edilmiştir. Benzer şekilde iki tütün ve iki biber bitkisi pozitif kontrol olarak inokule edilmiştir. İnokülasyondan yarım saat sonra bütün bitkiler fazla karborondan ve virüslerden temizlenmesi için su ile yıkanmıştır. Bitkiler mekanik inokülasyondan sonra bir gün karanlıkta tutulmuştur. Daha sonra, bitkiler uygun yukarıda söz edildiği şekilde yetiştirme koşullarında iklim odasında tutulmuştur. Bir hafta sonra bitkiler aynı şekilde tekrar inokule edilmiştir.

### 3.3. Fenotipik Karakterizasyon

Bitkilerin virüs inokülasyonlarına gösterdikleri tepkileri (simptom gelişimi) belirlemek için görsel olarak 1-5 skalası ve DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) yöntemi kullanılmıştır. İlk inokülasyondan iki hafta sonra, inokule edilen yapraklar toplanmış ve ELISA yapılarak inokülasyonun başarılı olup olmadığı belirlenmiştir. ELISA analizleri CLARK ve ADAMS (1977) tarafından tanımlanan yöntemle yapılmıştır.

Virüslerle inokülasyondan sekiz hafta sonra her bir bitki simptom gelişimi bakımından görsel olarak skorlanmıştır. İlk görsel belirtiler inokülasyondan sonra 7-10 gün içerisinde görülmeye başlanmıştır. Simptom seviyelerine göre 1 ve 5 arasında skorlanmıştır. 1 = hiç bir simptom gelişmemiştir; 2= çok az klorosis gözlenmiştir; 3= bazı klorosis ve mozayik gelişmeye başlamıştır; 4= çok miktarda mozaik ve yaprak bozulmaları oluşmaya başlamıştır; 5= çok miktarda mozayik gelişimi ve yaprak ve meyvelerde bozulmalar hatta bitki ölümleri oluşmuştur (Şekil 2).



Şekil 2. CMV simptomları ve 1-5 skalası.



DAS ELISA analizleri için inokule edilmiş yapraklar inokulasyondan 15 gün sonra toplanmıştır. Sistemik (inokule edilmeyen) yapraklar ise inokule edilen yaprakların 2–3 yaprak üstündeki yaprakların alınmasıyla inokulasyondan bir ay sonra toplanarak DAS-ELISA metodu ile ADAMS ve CLARK (1977)'in önerdiği şekilde uygulanmıştır. Agdia firmasından sağlanan antikorlar (Alkalin peroksidaz) kullanılmıştır. Toplanan bitki yaprakları merdane (sap roller) yardımı ile ezilerek suyu alınmış ve yaprak suyu 1:10 oranında (2 damla yaprak suyu:900 µl ekstraksiyon tamponu) ekstraksiyon tamponu içerisinde seyreltilmiştir. Ekstraksiyon tamponu 1L PBST tamponu içerisinde 20 g PVP (polyvinilprolidon), 1,3 g Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>-susuz, 0,2 g NaN<sub>3</sub>, 2 g albumin, 20 g Tween-20 çözülüp, pH7,4'e ayarlanarak kullanılmıştır. Kaplama tamponu, 1L distile su içerisinde 1,59 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2,93 g NaHCO<sub>3</sub>, 0,2 g NaN<sub>3</sub> çözülüp pH 9,6'ya ayarlanarak hazırlanmıştır. CMV, TMV ve PVY virüslerine özgün capture anti-PVY antikor 1:200 oranında kaplama tamponu içerisinde seyreltilmiştir. ELISA mikrolakası (Nunc-Immuno Plates MaxiSorp F96, Bioreba) her bir kuyucuğa 100 µl kaplama tamponuyla seyreltilmiş spesifik antikor yüklenerek kaplanmıştır. Mikrolakalar, streç film ile sıkıca sarılmış ve nemli bir bezin arasına konulup kapaklı bir kutu içerine yerleştirilerek 16 saat 4°C'de bekletilmiştir. 16 saat sonra mikrolakalar dört kere yıkama tamponu (PBST) ile Mikrolaka Yıkayıcısı (ASYS Hitech GmbH-Atlantis) cihazında yıkanmıştır. Bioreba firmasından hazır olarak alınan toz halindeki yıkama tamponu, 1L distile su içerisinde 10 g çözülerek hazırlanmıştır. Ekstraksiyon tamponu içinde seyreltilen ve buz üzerinde muhafaza edilen yaprak öz suları (antijen)'nden her bir kuyucuğa 100 µl yüklenmiştir. Mikrolakalar streç film ile sıkıca sarılmış ve nemli bir bezin arasına konulup kapaklı bir kutu içerine yerleştirilerek 16 saat 4°C'de bekletilmiştir. 16 saat sonra tabaklar tekrar dört kere yıkama tamponu (PBST) ile Mikrolaka Yıkayıcısı cihazında yıkanmıştır. Peroks enzim konjugatı anti-PVY, CMV ve TMV antikorları ile 1:200 oranından konjugasyon tamponu içerisinde seyreltilmiştir. Konjugasyon tamponu 1:4 oranında MRS (Agdia) ve PBST çözelti karışımından hazırlanmış ve mikrolakadaki her bir kuyucuğa 100 µl yüklenmiştir. Mikrolakalar, streç film ile sıkıca sarılmış ve nemli bir bezin arasına konulup kapaklı bir kutu içerine yerleştirilerek 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. İki saat sonra mikrolakalar tekrar dört kere yıkama tamponu (PBST) ile Mikrolaka Yıkayıcısı cihazında yıkanmıştır. Her bir kuyucuğa TMB peroksidaz substrat solüsyonundan (Agdia) 100 µl yüklenmiş ve mikrolakalar yine aynı şekilde kapaklı kutu içerisine konularak 30–60 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Mikrolakalardaki renk

değişikliği ELISA Mikroplaka Okuyucusu (Thermolabsystems-MultiskanEX) cihazı ile fotometrik olarak 630 nm (PVY için) ve 405 nm (CMV için)'de ölçülmüştür. Pozitif ve negatif kontroller Agdia firmasından sağlanmıştır. Negatif kontrol için seçilen bitkilerin ELISA sonuçlarının ortalamasının iki katı pozitif yani hasta olarak kabul edilmiştir.

### 3.4. Genotipik karakterizasyon

Her bir bitki DNA'sı Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kiti kullanılarak çıkarılmıştır. Bu çalışmada, AFLP, SSR (mikrosatellite) ve CAP işaretleyicileri CMV için biber dayanıklılık genlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Projede yer almasına rağmen diğer araştırmacılar tarafından TMV ve PVY dayanıklılığında rol oynayan genler haritalandığı ve bu genlerle bağlantı gösteren işaretleyiciler belirlendiği için ayrıca bu projede de bir haritalama çalışması yapılmamıştır.

Haritalama çalışmasında kullanılan bütün metodlar PCR'a dayalıdır. Her bir işaretleyici polimorfik olup olmadıklarını testlemek için öncelikle anaç DNA'larında testlenmiştir. Sadece polimorfik bulunan işaretleyiciler haritalama popülasyonunda uygulanmıştır. AFLP analizleri için biber'de çalıştığı daha önceki çalışmalarda belirtilen 13 primer kombinasyonu kullanılmıştır (Tablo 1). AFLP analizinde ilk adım genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesidir. Bunun için, 5 µl DNA (~250 ng), 5 µl 5x reaksiyon tampon çözeltisi, 2 µl *EcoR I/Mse I* ve 13 µl steril dH<sub>2</sub>O içeren karışım 1.5 µl mikrosantrifüj tüpü içerisine konur, karıştırılır ve 2 saat süreyle 37°C'de inkübe edilir. Daha sonra, restriksiyon endonuklease aktivitesini inaktif hale getirmek için, bu karışım 15 dakika süreyle 70°C'de tutulur. İkinci aşamada, 24 µl adaptör bağlama solüsyonu ve 1 µl T4 DNA ligase enzimi DNA karışımına eklenir ve iki saat süreyle 20°C'de inkübe edilir. Bu bağlama karışımı 1:10 oranında TE tampon çözeltisi (10 µl mixture + 90 µl TE tampon çözeltisi) ile dilüsyon edilir. Üçüncü aşama, ön amplifikasyon reaksiyonunun hazırlanmasıdır. Bu aşamada, 40 µl ön amplifikasyon primer karışımı, ön aşamada hazırlanmış olan 5 µl dilüsyon edilmiş kalıp DNA, 5 µl 10x PCR tampon çözeltisi + Mg ve 1 µl *Taq* DNA polimerase enzimi içeren karışım 0.5 ml mikrosantrifüj tübü içerisine eklenir ve iyice karıştırılır. Santrifügasyondan sonra, karışım müteakip profil (94°C/30 saniye, 56°C/1 dakika, 72°C/1 dakika ve 20 döngü; 4°C'de tutulur) kullanılarak PCR ile çoğaltılır. Bu PCR reaksiyonundan 3 µl ürün alınır ve 147 µl TE tampon çözeltisi içerisinde dilüsyon edilir. Son aşama seçici AFLP amplifikasyonudur. Bu aşamada, iki reaksiyon karıştırılır. İlk karışım (karışım 1) 2.5

$\mu\text{l}$  işaretlenmiş *EcoRI* primeri, 1.5  $\mu\text{l}$  *MseI* primeri (dNTP içerir) ve 1  $\mu\text{l}$  steril  $\text{dH}_2\text{O}$  içerir. İkinci karışım (karışım 2) 2  $\mu\text{l}$  10x PCR tampon çözeltisi + Mg, 0.1  $\mu\text{l}$  *Taq* DNA polymerase enzimi ve 79  $\mu\text{l}$  steril  $\text{dH}_2\text{O}$  içerir. PCR reaksiyonunu başlatmak için, üçüncü aşamadan elde edilen 5  $\mu\text{l}$  dilüsyon edilmiş PCR ürünü, 5  $\mu\text{l}$  karışım 1 ve 10  $\mu\text{l}$  karışım 2 bir PCR tüpü içerisine konulur ve müteakip touchdown profili kullanılarak çoğaltılır (94°C/30 saniye, 65°C/30 saniye, 72°C/60 saniye; sonra 12 döngü PCR yapılır. Bu işlem için her bir döngüde bağlanma sıcaklığı 0.7°C düşürülür, son olarak, 94°C/30 saniye, 56°C/30 saniye, 72°C/1 dakika profili olan 23 döngülük bir PCR daha yapılır.

Table 1. AFLP primer kombinasyonları

EcoRI primerleri	MseI primerleri
E AAC	M CAC
E AAC	M CTG
E ACC	M CAA
E ACC	M CAC
E ACC	M CTA
E ACT	M CAG
E ACT	M CTA
E ACT	M CTG
E AGC	M CAA
E AGC	M CAT
E AGC	M CTC
E AGG	M CAA
E AGG	M CTA

Bütün bu PCR'lar sonrası, iki dilüsyon yapılır. İlk dilüsyon; 1:3 PCR ürünü/ $\text{dH}_2\text{O}$  (7  $\mu\text{l}$  PCR + 14  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$ ) dilüsyonudur. İkinci dilüsyon; 27  $\mu\text{l}$  örnek yükleme solüsyonu (SLS), 0.5  $\mu\text{l}$  işaretleyici standartı 600 bp ve ilk dilüsyondan 3  $\mu\text{l}$  kullanarak 1:10 hazırlanan dilüsyondur. Hazırlanan örnekler dizi analizi cihazı kabına yüklenir ve bir damla mineral yağ ile kaplanır. Daha sonra, örneklerin yüklendiği kap Beckman-Coulter Genetic Analysis System CEQ<sup>TM</sup>8800 içerisine yerleştirilir. Frag-4 metodu AFLP analizleri (ayırışma 90 °C, 120 saniye. ; capillary 50 °C; injeksiyon 2.0 kV, 30 saniye; ayırışma 4.8 kV, 60 dakika) için kullanılır. Bu aşamadan sonra, sonuçlar Tablo 2

de verilen parametrelere göre istenmeyen veya düşük kalite örnekleri çıkarmak için filterlenir.

Tablo 2. AFLP analizleri için filterleme parametreleri

İsim	Operator	Değerler
Analiz çıktısı	Eşit değil	geçer
Ortlama akım	>	13
Ortlama akım	<	6
Düşük D1 SNR	=	evet
Peak lerin sayısı	<	10
Akım değişikliği	>	5

SSR analizleri için, bu çalışmada Hpms işaretleyicileri kullanılmıştır. Hpms işaretleyicileri için, PCR reaksiyonları müteakip şekilde yapılmıştır: 25 µl reaksiyon karışımı 1 µl DNA (40-60 ng/µl), 2.5 µl 10X PCR tampon çözeltisi (1x), 0.5 µl dNTP (0.2 mM), her birinden 0.5 µl olmak üzere ileri (Forward) ve geri (Reverse) primerler (10 pmol), 0.25 µl Taq polymerase enzimi (0.25 U) ve 19.75 µl sterile dH<sub>2</sub>O içermektedir. PCR reaksiyonları GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) ısıdüzenleme cihazı kullanılarak yapılmıştır. Hpms işaretleyicileri için PCR işlemi, hazırlanan karışım ısıdüzenleme cihazında 94°C'de 5 dakika tutulduktan sonra her bir döngü; 94°C'de 30 saniye, 50 veya 55°C'de 45 saniye, 72°C'de 45 saniye tutularak 35 döngü yapılmıştır. Son döngüden sonra örnekler 72°C'de 5 dakika tutularak şlem tamamlanmıştır. PCR ürünleri ileriki analizler yapılmaya kadar 4°C tutulmuştur. Son olarak, PCR ile elde edilen ürünler arasındaki uzunluk farklarını belirlemek için örneklerin hepsi 1 x TBE tampon çözeltisi kullanılarak hazırlanan 2-4% agaroz jelde yürütülmüştür ve dökümantasyon (Alpha Inotech) sistemi kullanılarak görüntülenmiştir.

COSII işaretleyicileri CAP tipi işaretleyicilerdir. COSII işaretleyicileri için PCR reaksiyonları müteakip şekilde uygulanmıştır (FRARY ve ark., 2004: 25 µl reaksiyon karışımı 1 µl DNA (40-60 ng/µl), 2.5 µl 10X PCR tampon çözeltisi (1x), 0.5 µl dNTP (0.2 mM), her birinden 0.5 µl olmak üzere ileri (Forward) ve geri (Reverse) primerler (10 pmol), 0.25 µl Taq polymerase enzimi (0.25 U) ve 19.75 µl steril dH<sub>2</sub>O içermektedir. PCR reaksiyonları GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) thermocycler cihazı kullanılarak yapılmıştır. CosII işaretleyicileri müteakip PCR profili (35 döngü için 94°C/5 dakika, 94°C/30 saniye, 50°C/45 saniye, 72°C/45 saniye 72°C/5 dakika ve 4°C tutulur) kullanılarak çoğaltılmıştır. Amplifikasyonu müteakiben, PCR

ürünleri %1 lik agarose jel kullanılarak amplifikasyonun olup olmadığı kontrol edilmiş ve PCR çalışmış ise. elde edilen PCR ürünü polimorfizm sağlayan uygun bir restriksiyon enzimi ile kesimlenmiştir. Bu işlem için 15 µl PCR ürünü, 1.5 µl 10x kesimleme tampon çözeltisi (1x), 0.2 µl (100x) BSA (1x) (enzim için gerekliyse), 0.5 µl restriksiyon enzimi ve 2.8 µl steril dH<sub>2</sub>O kullanılmıştır. Reaksiyon kullanılan enzim tipine bağlı olarak uygun sıcaklıklarda enaz 3-4 saat olmak üzere inkübe edilmiştir. Son olarak, örnekler parçacıkların ayrıştırılması için 1 xTBE tampon çözeltisi içerisinde hazırlanan 2-4% agarose jelde yürütülmüş ve dökümantasyon (Alpha Inotech) sistemi kullanılarak görüntülenmiştir.

QTL haritalama çalışmaları için genotipik ve fenotipik veriler basit doğrusal regresyon kullanılarak ve qGENE bilgisayar programı (NELSON, 1997) yardımı ile analiz edilmiştir. Yapılan analizlerde işaretleyici ve fenotip arasında  $P \leq 0.01$  daha düşük seviyede olması bir QTL'in varlığını ortaya koymak için sınır değer olarak kullanılmıştır.

## **4. Bulgular ve Tartışma**

### **4.1. TMV, PVY ve CMV dayanıklılık genlerinin Türk çeşitlerine aktarılması**

Çalışma 1 Eylül 2002 tarihinde resmen başlatılmıştır. İlk aşamada, çalışmanın virüs testleri ve gen haritalama çalışmaları için gerekli alet ekipmaların temin edilmesine başlanmıştır. İlk altı aylık süreç içerisinde virüs testlerinde kullanılmak üzere ELISA okuyucu ve haritalama çalışmalarında kullanılmak üzere PCR cihazı alınmıştır. Ayrıca, bu süreç içerisinde projede kullanılacak diğer sarf malzemeler ve kitlerde satın alınmıştır. İlk hedef olarak Tütün Mozayik Virüsü seçilmiştir. Yapılan virüs testlemelerinde 20 ileri ıslah hattı (F<sub>8</sub>, *C. annuum* x *C. frutescens*), 6 dayanıksız kontrol (*C. annuum*) ve 8 adet *C. chinense* ve *C. frutescens* türlerine ait tohum örnekleri (accessions) kullanılmıştır. Her bir hattan en az 10 bitki testlemelerde kullanılmıştır. Denemede kullanılan hatların TMV virüsüne reaksiyonları ELISA testi ile belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 3. TMV testleme sonuçları

Genetik Materyal	Soykütüğü (Pedigree)	İnokule Edilen Bitki Sayısı	Sonuçlar±Standart Sapma (Minimum/Maximum)	Semptomlar
<i>C.annuum</i> California Wonder	02P20	7	0.44±0.05	İnokule edilen yapraklarda mozayik belirtileri
<i>C.annuum</i> x <i>C.frutescens</i> , F <sub>8</sub>	02P07	9	0.03±0.01 (p<0.0001)	Sadece inokule edilen yapraklarda nekrotik belirtiler
<i>C.annuum</i> x <i>C.frutescens</i> , F <sub>8</sub>	02P33	11	0.06±0.01 (p<0.0001)	Sadece inokule edilen yapraklarda nekrotik belirtiler
<i>C.annuum</i> TR 70634	02P19	8	0.27±0.07 (p = 0.06)	Genel yaprak dökülmesi var

Tablo 3’den de görüldüğü gibi ileri ıslah hatları (en az 10 bitki) TMV inokulasyonuna negatif tepki göstermiştir (yani dayanıklı bulunmuştur). Yapılan istatistiki analizlerde, iki ileri ıslah hattı (02P07 ve 02P33)’na ait ELISA değerleri dayanıksız kontrol cv. California Wonder (02P20)’la kıyaslandığında önemli derecede farklı oldukları belirlenmiştir. İleri ıslah hatlarında tespit edilen bu dayanıklılık homozigot haldedir çünkü test edilen bütün bitkiler dayanıklılık göstermiştir. Bu sonuçlar zaten beklenmektedir. Çünkü, Cornell araştırmacıları ile yapılan görüşmelerde de bu hatların TMV izolatlarına dayanıklı olacağı belirtilmiştir. Bu arada TMV ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda TMV dayanıklılığını sağlayan genin biber genomundaki yeri belirlenmiş ve TMV dayanıklılık geni *L* simgesiyle işaretlenmiş ve biber genomunda 11. kromozom üzerinde haritalanmıştır. Dolayısıyla, bu projede TMV için ayrıca bir haritalama çalışması yapılmasına gerek kalmamıştır. Ancak, dayanıklılık genlerinin Türk çeşitlerine aktarılması için ilk testlemelerde dayanıklı bulunan yada dayanıklılığı doğrulanan F<sub>8</sub> hatları Bağcı Çarliston (02P19), Sera Demre, Dolmalık Biber çeşitleri ile melezlenmiştir. Tablo 4 de proje kapsamında yapılan melezleme kombinasyonları verilmiştir.

Tablo 4. TMV dayanıklı hatlarla yapılan melez kombinasyonları

Ana Hat	Baba (tozlayıcı) Hat	F <sub>1</sub>
<i>Capsicum annuum</i> cv Dolmalık	TMV-F <sub>8</sub> ( <i>C. annuum</i> x <i>C. frutescens</i> )	+
<i>Capsicum annuum</i> cv Dolmalık	CMV-F <sub>8</sub> -1 ( <i>C. annuum</i> x <i>C. frutescens</i> )	+
<i>Capsicum annuum</i> cv Dolmalık	<i>C. annuum</i> (CGN16844)	+
<i>Capsicum annuum</i> cv Dolmalık	CMV-F <sub>8</sub> -2 ( <i>C. annuum</i> x <i>C. frutescens</i> )	+
<i>Capsicum annuum</i> cv Çarliston	CMV-F <sub>8</sub> -2 ( <i>C. annuum</i> x <i>C. frutescens</i> )	+
<i>Capsicum annuum</i> cv Çarliston	CMV-F <sub>8</sub> -1 ( <i>C. annuum</i> x <i>C. frutescens</i> )	+
<i>Capsicum annuum</i> cv Çarliston	<i>C. annuum</i> (CGN16844)	+
<i>Capsicum annuum</i> cv Çarliston	TMV-F <sub>8</sub> ( <i>C. annuum</i> x <i>C. frutescens</i> )	+
<i>Capsicum annuum</i> cv C. Wonder	CMV-F <sub>8</sub> -2 ( <i>C. annuum</i> x <i>C. frutescens</i> )	+
<i>Capsicum annuum</i> cv Serademre	CMV-F <sub>8</sub> -2 ( <i>C. annuum</i> x <i>C. frutescens</i> )	+

Tablo 4'den de görüldüğü gibi TMV dayanıklı F<sub>8</sub> hatları değişik kombinasyonlarda melezlemelerde kullanılmış ve çok sayıda F<sub>1</sub> hatları üretilmiştir. Oluşturulan bu F<sub>1</sub>'ler ve CMV ve TMV dayanıklı F<sub>8</sub> hatları CMV ile testlenmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. Melezlemelerde kullanılan bazı anaçlar ve F<sub>1</sub> melezleri ile yapılan CMV testleme sonuçları.

Genotip	Pedigri Numarası	Açıklama	ELISA değeri	Tepki (R/S)
Tütün		Duyarlı kontrol	0.709	S
Tütün		Duyarlı kontrol	0.865	S
Tütün		Duyarlı kontrol	1.009	S
Tütün		Bufer inokülasyonu	0.003	R
Tütün		Bufer inokülasyonu	0.003	R
Tütün		Bufer inokülasyonu	0.002	R
03P1	02P19X02P35	TR70634 x TMV R F <sub>8</sub>	1,5905	S
03P1	02P19X02P35	TR70634 x TMV R F <sub>8</sub>	1,205	S
03P1	02P19X02P35	TR70634 x TMV R F <sub>8</sub>	0,1315	R
03P1	02P19X02P35	TR70634 x TMV R F <sub>8</sub>	0,797	S
03P1	02P19X02P35	TR70634 x TMV R F <sub>8</sub>	2,277	S
03P2	02P19X02P03	TR70634 x CMV R F <sub>8</sub>	2,6365	S
03P2	02P19X02P03	TR70634 x CMV R F <sub>8</sub>	0,0165	R
03P2	02P19X02P03	TR70634 x CMV R F <sub>8</sub>	0,0525	R
03P2	02P19X02P03	TR70634 x CMV R F <sub>8</sub>	1,0445	S
03P2	02P19X02P03	TR70634 x CMV R F <sub>8</sub>	0,315	S
03P3	02P20X02P36	CGN16842 x CMV R F <sub>8</sub>	2,459	S
03P3	02P20X02P36	CGN16842 x CMV R F <sub>8</sub>	0,202	S

03P3	02P20X02P36	CGN16842 x CMV R F <sub>8</sub>	0,0315	R
03P3	02P20X02P36	CGN16842 x CMV R F <sub>8</sub>	3,4435	S
03P4	02P18X02P3	TR70630 x CMV R F <sub>8</sub>	0,0755	R
03P4	02P18X02P3	TR70630 x CMV R F <sub>8</sub>	0,0445	R
03P4	02P18X02P3	TR70630 x CMV R F <sub>8</sub>	1,7495	S
03P4	02P18X02P3	TR70630 x CMV R F <sub>8</sub>	1,1225	S
03P5	02P35Xcv.Serademre	TMV R F <sub>8</sub> x Serademre	0,0205	R
03P5	02P35Xcv.Serademre	TMV R F <sub>8</sub> x Serademre	0,1155	S/R
03P5	02P35Xcv.Serademre	TMV R F <sub>8</sub> x Serademre	1,4045	S
03P5	02P35Xcv.Serademre	TMV R F <sub>8</sub> x Serademre	3,017	S
03P5	02P35Xcv.Serademre	TMV R F <sub>8</sub> x Serademre	0,001	R
03P7-1	02P19X02P28	TR70634 x CGN16854	0,018	R
03P7-2	02P19X02P28	TR70634 x CGN16854	2,889	S
03P7-3	02P19X02P28	TR70634 x CGN16854	2,295	S
03P7-4	02P19X02P28	TR70634 x CGN16854	0,0045	R
03P7-5	02P19X02P28	TR70634 x CGN16854	0,024	R
03P8-1	02P19X02P36	TR70634 x CMV R F <sub>8</sub>	0,01	R
03P8-2	02P19X02P36	TR70634 x CMV R F <sub>8</sub>	2,6845	S
03P8-3	02P19X02P36	TR70634 x CMV R F <sub>8</sub>	0,4995	S
03P8-4	02P19X02P36	TR70634 x CMV R F <sub>8</sub>	2,3805	S
03P9-1	02P18	TR70630	0,1655	S
03P9-2	02P18	TR70630	1,9325	S
03P10-1	02P19	TR70634	3,535	S
03P10-2	02P19	TR70634	1,1665	S
03P10-3	02P19	TR70634	0,095	S
03P10-5	02P19	TR70634	0,0975	S
03P11-3	02P20	CGN16842	0,904	S
03P11-4	02P20	CGN16842	nd	
03P11-5	02P20	CGN16842	0,2765	S
03P11-6	02P20	CGN16842	2,494	S
03P12-1	02P28	CGN16854	0,0715	S
03P12-2	02P28	CGN16854	0,0155	R
03P12-3	02P28	CGN16854	0,068	R
03P12-4	02P28	CGN16854	2,5075	S
03P12-5	02P28	CGN16854	1,64	S
03P13-1	02P3	CMV R F <sub>8</sub>	0,0135	R
03P13-2	02P3	CMV R F <sub>8</sub>	0,0465	R
03P13-3	02P3	CMV R F <sub>8</sub>	0,017	R
03P13-4	02P3	CMV R F <sub>8</sub>	0,0285	R
03P13-5	02P3	CMV R F <sub>8</sub>	-0,0055	R
03P10(C)	02P19		0,02	R
03P3(C)	02P20X02P36		0,002	R
09P11 (none)	02P20		0,03	R
03P8 (none)	02P19X02P36		0,021	R



Tablo 5’den de görüldüğü gibi CMV ve TMV dayanıklı *Capsicum frutescens*’ten türetilmiş F<sub>8</sub> hatları (03P13-1 - 03P13-5) CMV’ye karşıda homozigot düzeyde dayanıklılık göstermiştir. Bu hatların dayanıklılığı Tablo 3’de verilen sonuçlarla paralellik göstermektedir. Denemede duyarlı kontrol olarak kullanılan *C. annuum*’ların çoğu bu testlemede de dayanıksız bulunmuştur. Yalnız 02P28 pedigri nolu hattın viruse dayanıklı olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle bu testlemede bazı bitkiler dayanıklı bulunmuştur. Denemede kullanılan değişik F<sub>1</sub> melez kombinasyonları ise CMV inokulasyonuna değişen düzeylerde tepkimeler vermiştir. Bazı F<sub>1</sub>’lar dayanıklı olurken bazıları da dayanıksız olarak belirlenmiştir. Bu beklenen bir sonuçtur. Çünkü, *Capsicum frutescens*’ten gelen CMV dayanıklılığı kantitatif kalıtım göstermektedir. Daha önceki yapılan çalışmalarda da benzeri sonuçlar bulunmuştur. Dayanıklı bulunan F<sub>1</sub> bitkileri seçilmiş ve kendilenmeye bırakılmış ve seçilen bazı dayanıklı F<sub>1</sub>’ler uygun anaçlarına geriye melezlenerek BC<sub>1</sub> populasyonları oluşturulmuştur (Tablo 6). Bu populasyonları oluşturmanın esas amacı dayanıklılıkta rol oynayan genleri Türk çeşitlerine aktarılmasıdır.

Tablo 6. Proje kapsamında gerçekleştirilen melezleme kombinasyonları, generasyonlar ve üretilen tohum sayısı.

<b>Melez Kombinasyonları</b>	<b>Generasyon</b>	<b>Üretilen Tohum Sayısı</b>
02P19 X 02P03	F <sub>2</sub>	670
02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	750
SERADEMRE X 02P35	F <sub>2</sub>	450
02P19 X 02P28	F <sub>2</sub>	690
02P20 X 02P36	F <sub>2</sub>	125
02P19 X 02P36	F <sub>2</sub>	1000
02P18 X 02P03	F <sub>2</sub>	1420
02P19 X 02P03	F <sub>2</sub>	250
02P19 X 02P28	F <sub>2</sub>	410
02P28 X (02P19 X 02P28)	BC <sub>1</sub>	178
02P18 X (02P18 X 02P03)	BC <sub>1</sub>	180

Melezleme çalışmaları devam ederken, bir yandanda testlenmeleri yapılmamış F<sub>8</sub> ileri hatlarının ve bu hatlarla bazı Türk biber çeşitleri arasında yapılan melezlemelerden

türetilen F<sub>1</sub> melezlerin CMV ile testlemelerine devam edilmiştir. Sonuçlar Tablo 5’te verilmiştir.

Tablo 7. Bazı F<sub>8</sub> hatları ve bu hatlarla yapılan melez kombinasyonlarının CMV ile testleme sonuçları.

Genotip	Pedigri numarası	İnoküle edilmemiş yapraklar (ELISA)	İnoküle edilmiş yapraklar (ELISA)	Fenotipik skorlama (1-5 skalası)	Tepki
	Ex.Buffer	0.16			
	Pos.Cont.	3.2			
	Neg.Cont.	0.07			
02P35	04T418-1	1.0785	0.597	5	S
02P35	04T418-2	0.061	0.389	1	R
02P35	04T418-3	0.5005	1.032	3	S
02P35	04T418-4	0.3185	0.977	1	S
02P35	04T418-5	0.6045	0.797	4	S
02P35	04T418-6	0.3545	0.641	3	S
02P35	04T418-7	0.3905	0.966	3	S
02P35	04T418-8	0.3215	1.047	3	S
02P35	04T418-9	0.3615	-	3	S
02P35	04T418-10	0.326	-	2	S
02P35	04T418-11	0.2445	-	1	
02P35	04T418-12	0.1385	0.98	3	S
02P35	04T418-13	0.531	0.793	3	S
02P35	04T418-16	0.2515	1.271	2	S
02P35	04T418-17	0.2925	2.052	1	S
02P35	04T418-18	1.7905	0.871	4	S
02P35	04T418-19	0.55	-	2	R?
02P35	04T418-20	0.081	0.435	1	R
02P35	04T418-21	0.485	2.553	4	S
02P35	04T418-22	0.4535	0.694	3	S
02P35	04T418-23	0.4185	0.751	5	S
02P35	04T418-24	0.4885	0.934	4	S
02P35	04T418-25	-0.034	-	-	-
02P35	04T418-26	1.268	-	-	-
02P35	04T418-27	0.385	1.719	3	S
Serademre	04T419-1	0.4115	-	4	S
Serademre	04T419-2	0.5405	1.42	5	S
Serademre	04T419-4	0.4915	2.194	4	S
Serademre	04T419-5	0.427	-	5	S
Serademre	04T419-6	0.873	1.242	5	S
Serademre	04T419-7	0.281	0.914	5	S
Serademre	04T419-8	0.559	1.376	5	S
Serademre	04T419-9	0.4125	1.148	3	S
Serademre	04T419-10	1.0175	1.049	4	S

Serademre	04T419-11	0.531	1.149	5	S
Serademre	04T419-12	0.064	0.415	1	?
Serademre	04T419-13	0.275	1.327	5	S
Serademre	04T419-14	0.4325	1.81	4	S
Serademre	04T419-15	-	0.785	1	S
Serademre	04T419-16	0.694	1.44	3	S
Serademre	04T419-17	0.1905	1.432	3	S
Serademre	04T419-18	0.633	0.677	5	S
Serademre	04T419-19	0.4495	0.992	5	S
Serademre	04T419-20	0.502	1.014	4	S
Serademre	04T419-21	0.5	3.13	5	S
Serademre	04T419-22	0.623	1.431	5	S
Serademre	04T419-23	0.6185	1.803	-	S
02P35 X Serademre	04T420-1	0.361	2.007	4	S
02P35 X Serademre	04T420-2	0.4245	1.212	3	S
02P35 X Serademre	04T420-3	0.6485	1.79	3	S
02P35 X Serademre	04T420-4	0.5665	-	4	S
02P35 X Serademre	04T420-5	0.4575	1.439	5	S
02P35 X Serademre	04T420-6	0.4825	1.256	5	S
02P35 X Serademre	04T420-7	0.808	1.459	5	S
02P35 X Serademre	04T420-8	0.083	-	1	R
02P35 X Serademre	04T420-9	0.6095	1.622	4	S
02P35 X Serademre	04T420-10	0.6055	1.27	4	S
02P35 X Serademre	04T420-11	0.375	1.399	5	S
02P35 X Serademre	04T420-12	-	1.648	4	S
02P35 X Serademre	04T420-13	0.6285	1.29	4	S
02P35 X Serademre	04T420-14	0.104	0.313	1	R
02P35 X Serademre	04T420-15	0.329	0.935	5	S
02P19	04T421-1	0.109	0.481	1	R
02P19	04T421-2	0.0465	-	-	-
02P19	04T421-3	-0.086	-	-	-
02P19	04T421-5	0.2665	-	-	S
02P19	04T421-7	1.48	0.9	3	S
02P19	04T421-8	-0.066	-	-	-

02P19	04T421-9	-0.061	0.443	1	?
02P19	04T421-10	0.3625	0.781	3	S
02P19	04T421-12	-	1.917	4	S
02P19	04T421-13	0.4425	2.148	5	S
02P19	04T421-14	0.2265	-	-	-
02P19	04T421-15	0.724	-	3	S
02P19	04T421-16	0.016	0.467	1	?
02P19	04T421-18	0.4035	0.967	5	S
02P19	04T421-20	0.4805	1.299	4	S
02P19	04T421-21	0.798	-	1	-
02P19X02P35	04T422-1	0.0265	-	1	-
02P19X02P35	04T422-2	0.0065	-	1	-
02P19X02P35	04T422-3	0.1725	0.455	1	R
02P19X02P35	04T422-4	0.4475	1.774	4	S
02P19X02P35	04T422-5	0.279	-	4	S
02P19X02P35	04T422-6	0.9885	1.168	5	S
02P19X02P35	04T422-7	0.0915	-	1	R
02P19X02P35	04T422-8	0.349	1.845	2	S
02P19X02P35	04T422-9	0.4575	2.313	5	S
02P19X02P35	04T422-10	0.508	1.849	4	S
02P19X02P35	04T422-11	0.719	2.131	3	S
02P19X02P35	04T422-12	0.615	1.569	2	S
02P19X02P3	04T423-1	0.013	-	1	R
02P19X02P3	04T423-2	0.065	-	1	R
02P19X02P3	04T423-3	0.598	-	4	S
02P19X02P3	04T423-4	1.572	0.523	3	S
02P19X02P3	04T423-5	0.013	0.383	1	R
02P19X02P3	04T423-6	0.082	-	-	-
02P19X02P3	04T423-7	0.045	-	-	-
02P19X02P3	04T423-8	0.388	2.115	-	S
02P19X02P3	04T423-9	0.044	-	1	R
02P19X02P3	04T423-10	0.062	-	1	R
02P19X02P3	04T423-11	0.2365	-	1	R
02P19X02P3	04T423-12	0.1035	-	1	R
02P19X02P3	04T423-13	0.2815	-	1	R
02P19X02P3	04T423-25	-0.056	-	-	-
02P3	04T424-1	0.808	-	-	-
02P3	04T424-3	1.288	-	2	S
02P3	04T424-5	0.6425	1.511	5	S
02P3	04T424-6	-0.0505	-	-	R

Tablo 7 de verilen çalışmalarda 02P35 (TMV için seçilmiş F<sub>8</sub> hattı), Sera Demre (dayanıksız kontrol), 02P19 (Bağcı Çarliston-CMV dayanıksız çeşit) ve 02P3 (CMV için seçilmiş F<sub>8</sub> hattı) deneme materyali olarak kullanılmıştır. Tablo 7'den de görüldüğü gibi her iki dayanıksız kontrol Sera Demre ve Bağcı Çarliston hem yüksek fenotipik skorlar ve hemde yüksek ELISA değerleri vermiştir. Bazı Sera Demre ve

Bağcı Çarliston bitkilerinde görülen düşük değerler ise tamamen denemelerde bu bitkilerin virüsle inoküle edilememesinden kaynaklanmaktadır. 02P35 bitkilerinin büyük bir çoğunluğu hem fenotipik skorlamada ve hemde ELISA sonuçlarında yüksek değerler vermiştir. Bu sonuç bu hattın aslında TMV için seçilmiş bir hat olduğu için beklenebilmektedir. Aynı zamanda bu hatla Sera Demre F<sub>1</sub> melezleride yüksek fenotipik skorlama ve ELISA değerleri vermiştir. Dolayısıyla bu hattın CMV dayanıklılığı taşımadığı sonucuna varılmıştır. 02P3 CMV'ye dayanıklı F<sub>8</sub> hattıdır. Bu denemede sadece 4 adet bitki çalışmada kullanılmıştır (düşük çimlenmeden dolayı) ve dolayısıyla bu denemede elde edilen sonuçlarla bu hat hakkında sağlıklı kararlar verilememiştir. Daha önceki yapılan çalışmalarda ise bu hat CMV'ye dayanıklılık bakımından en umutlu hat olarak göze çarpmıştır (Tablo 5). Ancak ilginç bir şekilde 02P3 hattından türetilen F<sub>1</sub> bitkilerinin çoğu dayanıklı bulunmuşlardır. Bazı F<sub>1</sub>'lerin dayanıksız olması ise bu karakterin kantitatif kalıtım göstermesinden veya kısmi dominant bir özelliğe olmasından kaynaklanmaktadır. Ancak yinede bu sonuç bu 02P3 pedigri numaralı F<sub>8</sub> hattının CMV'ye dayanıklılıkta kullanılabilirliğini göstermektedir. Bu denemeler sonucunda elde edilen dayanıklı F<sub>1</sub>'ler kendilenerek F<sub>2</sub> ve ilgili anaçlarıyla da geriye melezlenerek BC<sub>1</sub> populasyonları oluşturulmasında kullanılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda yapılan kendileme (F<sub>2</sub>) ve gerimelez (BC<sub>1</sub>) oluşturma çalışmalarından elde edilen sonuçlar Tablo 6'de özetlenmiştir.

Tablo 8. Kendileme (F<sub>2</sub>) ve gerimelez (BC<sub>1</sub>) oluşturma çalışmalarından elde edilen sonuçlar.

<b>Melez Kombinasyonları</b>	<b>Generasyon</b>	<b>Üretilen Tohum Sayısı</b>
02P19 (Bağcı Çarliston) X 02P03-1 (F8-98-3-C-1)	F <sub>2</sub>	>100
02P19 (Bağcı Çarliston) X 02P03-7 (F8-98-3-C-1)	F <sub>2</sub>	>100
02P19 (Bağcı Çarliston) X 02P03-9 (F8-98-3-C-1)	F <sub>2</sub>	>100
02P19 (Bağcı Çarliston) X 02P03-10 (F8-98-3-C-1)	F <sub>2</sub>	>100
02P19 (Bağcı Çarliston) X 02P03-12 (F8-98-3-C-1)	F <sub>2</sub>	>100
02P19 (Bağcı Çarliston) X 02P35-2 (F8-98-16-T-1)	F <sub>2</sub>	>100
02P19 (Bağcı Çarliston) X 02P35-3 (F8-98-16-T-1)	F <sub>2</sub>	>100
02P19 (Bağcı Çarliston) X 02P35-4 (F8-98-16-T-1)	F <sub>2</sub>	>100

02P19 (Bağcı Çarliston) X 02P19 (Bağcı Çarliston) X 02P03-7 (F8-98-3-C-1)	BC <sub>1</sub>	>100
02P19 (Bağcı Çarliston) X 02P19 (Bağcı Çarliston) X 02P03-9 (F8-98-3-C-1)	BC <sub>1</sub>	>100
02P19 (Bağcı Çarliston) X 02P19 (Bağcı Çarliston) X 02P35 (F8-98-16-T-1)	BC <sub>1</sub>	>100

Tablo 8’den de görüldüğü gibi her bir melezleme (F<sub>2</sub> ve BC<sub>1</sub>) kombinasyonlarından ileri çalışmalarda kullanılmak üzere yeterince tohum üretilmiştir.

Bu çalışmalara ilaveten, eldeki populasyon ve hatların TMV ve PVY dayanıklılığındaki kapasitelerini belirlemek için bu virüslerle de testlemelere devam edilmiştir. Değişik generasyonlardan toplam 352 bitki tütün mozayik virüsü (TMV) ile testlenmiştir (Tablo 9, 10). 05T1151, 05T1158, 05T1159, 05T1160, 05T1161, 05T1163, 05T1164 pedigr numaralı hatlar TMV-R F<sub>8</sub> hatları olup TMV’ye dayanıklı oldukları Cornell biber ıslahçıları tarafından rapor edilmiştir (Prof. Robinson, kişisel iletişim). Daha önceki çalışmalarda 20P35 (05T1151) nolu hat dayanıklı bulunmuş (Tablo 3) ve iki yerel biber çeşiti (*Capsicum annuum* cv. Sera Demre ve Bağcı Çarliston çeşitleri) ile melezlenmiştir. F<sub>1</sub>’larla yapılan testlemelerde dayanıklı bulunan F<sub>1</sub>’lar kendilenmek süretiyle F<sub>2</sub> generasyonları oluşturulmuştur. Mevcut dönemde iki F<sub>2</sub> populasyonu çalışmada kullanılmıştır.

Tablo 9. Tütün Mozayik Virüsü (TMV) testlemelerinde kullanılan genetik materyaller.

Pedigr Numarası	Genotip	Generasyon	Testlemede Kullanılan Bitki Sayısı
05T1151	02P19 X 02P35	F <sub>1</sub>	12
05T1152	02P35 X Sera Demre	F <sub>2</sub>	125
05T1153	02P35 (TMV-R)	Dayanıklı Anaç	9
05T1154	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	124
05T1156	02P18 (Dolmalık Biber)	Dayanıksız Çeşit	13
05T1157	02P19 (Bağcı Çarliston)	Dayanıksız Anaç	26
05T1158	C. annuum x C. furtescens (98-16-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	9
05T1159	C. annuum x C. furtescens (98-9-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	14
05T1160	C. annuum x C. furtescens (98-15-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	6
05T1161	C. annuum x C. furtescens	TMV-R F <sub>8</sub>	5

	(98-8-T-2)		
05T1163	C. annuum x C. furtescens (98-15-T-2)	TMV-R F <sub>8</sub>	6
05T1164	C. annuum x C. furtescens (98-8-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	3

Tablo 10. TMV visürü ile yapılan testlemeler (ELISA değerleri ve hatların reaksiyonları)

Pedigri Numarası	Genotip	Generasyon	ELISA Sonucu	Tepki (R / S)
05T1153-1	02P35 (TMV-R)	Dayanıklı Anaç	-0.425	R
05T1153-2	02P35 (TMV-R)	Dayanıklı Anaç	-0.034	R
05T1153-4	02P35 (TMV-R)	Dayanıklı Anaç	-0.339	R
05T1153-5	02P35 (TMV-R)	Dayanıklı Anaç	-0.414	R
05T1153-6	02P35 (TMV-R)	Dayanıklı Anaç	0.047	R
05T1153-8	02P35 (TMV-R)	Dayanıklı Anaç	-0.085	R
05T1153-9	02P35 (TMV-R)	Dayanıklı Anaç	-0.094	R
05T1153-10	02P35 (TMV-R)	Dayanıklı Anaç	-0.094	R
05T1157-1	02P19 (Bağcı Çarliston)	Dayanıksız Anaç	öldü	S
05T1157-2	02P19 (Bağcı Çarliston)	Dayanıksız Anaç	öldü	S
05T1157-3	02P19 (Bağcı Çarliston)	Dayanıksız Anaç	öldü	S
05T1157-4	02P19 (Bağcı Çarliston)	Dayanıksız Anaç	1.471	S
05T1157-5	02P19 (Bağcı Çarliston)	Dayanıksız Anaç	öldü	S
05T1157-6	02P19 (Bağcı Çarliston)	Dayanıksız Anaç	0.217	S
05T1157-7	02P19 (Bağcı Çarliston)	Dayanıksız Anaç	öldü	S
05T1157-8	02P19 (Bağcı Çarliston)	Dayanıksız Anaç	0.681	S
05T1157-9	02P19 (Bağcı Çarliston)	Dayanıksız Anaç	-0.12	R
05T1157-10	02P19 (Bağcı Çarliston)	Dayanıksız Anaç	-0.356	R
05T1157-11	02P19 (Bağcı Çarliston)	Dayanıksız Anaç	1.72	S
05T1157-12	02P19 (Bağcı Çarliston)	Dayanıksız Anaç	0.076	S
05T1157-13	02P19 (Bağcı Çarliston)	Dayanıksız Anaç	öldü	S
05T1151-1	02P19 X 02P35	F <sub>1</sub>	-0.211	R
05T1151-2	02P19 X 02P35	F <sub>1</sub>	-0.112	R
05T1151-3	02P19 X 02P35	F <sub>1</sub>	-0.091	R
05T1151-5	02P19 X 02P35	F <sub>1</sub>	-0.084	R
05T1151-6	02P19 X 02P35	F <sub>1</sub>	0.017	R
05T1151-8	02P19 X 02P35	F <sub>1</sub>	-0.1	R
05T1151-9	02P19 X 02P35	F <sub>1</sub>	0.008	R
05T1151-11	02P19 X 02P35	F <sub>1</sub>	-0.029	R
05T1151-12	02P19 X 02P35	F <sub>1</sub>	-0.088	R
05T1154-1	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	0.034	R
05T1154-2	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	1.513	S
05T1154-3	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	0.149	S
05T1154-5	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.098	R
05T1154-6	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	1.276	S
05T1154-7	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.013	R

05T1154-8	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	1.506	S
05T1154-9	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	0.062	S
05T1154-10	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.108	R
05T1154-11	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.002	R
05T1154-12	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	1.844	S
05T1154-13	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	öldü	S
05T1154-14	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	0.544	S
05T1154-15	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.03	R
05T1154-16	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.083	R
05T1154-17	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	0.093	S
05T1154-18	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.015	R
05T1154-19	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.06	R
05T1154-21	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	0.152	S
05T1154-24	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	öldü	S
05T1154-25	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	0.002	R
05T1154-26	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	öldü	S
05T1154-32	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.113	R
05T1154-28	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.373	R
05T1154-29	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	0.351	S
05T1154-30	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.061	R
05T1154-31	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.069	R
05T1154-32	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.062	R
05T1154-33	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	öldü	S
05T1154-35	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	öldü	S
05T1154-39	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.199	R
05T1154-40	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.419	R
05T1154-42	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.022	R
05T1154-43	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.084	R
05T1154-44	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.131	R
05T1154-45	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	1.667	S
05T1154-47	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.03	R
05T1154-49	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	0.136	S
05T1154-50	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.111	R
05T1154-52	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	0.692	S
05T1154-53	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	öldü	S
05T1154-54	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	1.808	S
05T1154-55	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.090	R
05T1154-57	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	1.121	S
05T1154-66	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	0.019	R
05T1154-73	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	öldü	S
05T1154-86	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.071	R
05T1154-88	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.087	R
05T1154-89	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	öldü	S
05T1154-90	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.072	R
05T1154-91	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.092	R
05T1154-92	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	0.272	S
05T1154-93	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	öldü	S
05T1154-94	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.098	R



05T1154-97	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.058	R
05T1154-98	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	0.121	S
05T1154-99	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	öldü	S
05T1154-100	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.025	R
05T1154-101	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	1.943	S
05T1154-102	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	öldü	S
05T1154-104	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	0.252	S
05T1154-106	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	1.415	S
05T1154-107	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	1.801	S
05T1154-108	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.002	R
05T1154-109	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	öldü	S
05T1154-110	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.023	R
05T1154-111	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	1.390	S
05T1154-113	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	öldü	S
05T1154-114	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	0.030	R
05T1154-117	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.113	R
05T1154-118	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.026	R
05T1154-119	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.057	R
05T1154-121	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.106	R
05T1154-122	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.089	R
05T1154-123	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.035	R
05T1154-124	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	öldü	S
05T1154-125	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	0.135	S
05T1154-127	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	öldü	S
05T1154-128	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	öldü	S
05T1154-129	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	öldü	S
05T1154-130	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	öldü	S
05T1154-131	02P19 X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.057	R
05T1152-3	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.079	R
05T1152-4	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.052	R
05T1152-5	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	0.095	S
05T1152-6	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.052	R
05T1152-7	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.01	R
05T1152-8	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.076	R
05T1152-9	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	0.001	R
05T1152-10	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	0.002	R
05T1152-11	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	1.378	S
05T1152-12	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.098	R
05T1152-14	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.043	R
05T1152-15	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	1.121	S
05T1152-16	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.089	R
05T1152-17	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.036	R
05T1152-18	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.083	R
05T1152-19	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.091	R
05T1152-21	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.103	R
05T1152-22	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	2.177	S
05T1152-23	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.094	R

05T1152-25	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	0.053	S
05T1152-26	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.061	R
05T1152-28	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	0.066	S
05T1152-29	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.114	R
05T1152-30	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.112	R
05T1152-31	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.073	R
05T1152-32	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.011	R
05T1152-35	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.049	R
05T1152-36	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.101	R
05T1152-37	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.091	R
05T1152-69	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	öldü	S
05T1152-39	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	0.081	S
05T1152-41	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	0.113	S
05T1152-42	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.092	R
05T1152-44	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.095	R
05T1152-45	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	0.009	R
05T1152-46	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	0.035	R
05T1152-47	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	0.221	S
05T1152-48	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.074	R
05T1152-50	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.089	R
05T1152-51	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.098	R
05T1152-52	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	0.010	R
05T1152-53	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.103	R
05T1152-55	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	1.016	S
05T1152-56	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.040	R
05T1152-57	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	0.212	S
05T1152-58	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.109	R
05T1152-59	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.072	R
05T1152-60	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.076	R
05T1152-61	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	0.128	S
05T1152-62	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.059	R
05T1152-63	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	öldü	S
05T1152-64	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	0.006	R
05T1152-65	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	0.005	R
05T1152-66	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.436	S
05T1152-66	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.361	R
05T1152-68	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.093	R
05T1152-69	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.125	R
05T1152-70	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	öldü	S
05T1152-71	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	0.340	S
05T1152-72	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.091	R
05T1152-74	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	1.400	S
05T1152-77	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	2.15	S
05T1152-78	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	0.083	S
05T1152-80	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.115	R
05T1152-81	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.083	R
05T1152-82	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.102	R
05T1152-83	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.077	R

05T1152-84	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.059	R
05T1152-85	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.127	R
05T1152-86	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.142	R
05T1152-88	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.061	R
05T1152-89	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.131	R
05T1152-90	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.037	R
05T1152-91	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.084	R
05T1152-92	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.108	R
05T1152-93	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.112	R
05T1152-94	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	2.724	S
05T1152-95	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.109	R
05T1152-96	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.099	R
05T1152-97	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.080	R
05T1152-98	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	0.092	S
05T1152-99	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	1.084	S
05T1152-100	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.358	R
05T1152-102	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	0.054	S
05T1152-103	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.316	R
05T1152-104	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.077	R
05T1152-105	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.365	R
05T1152-106	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.132	R
05T1152-107	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	1.307	S
05T1152-108	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	öldü	S
05T1152-109	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.402	R
05T1152-110	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	öldü	S
05T1152-111	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.354	R
05T1152-112	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.264	R
05T1152-113	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.211	R
05T1152-114	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	öldü	S
05T1152-115	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	öldü	S
05T1152-116	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.389	R
05T1152-117	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.431	R
05T1152-118	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	öldü	S
05T1152-119	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.070	R
05T1152-120	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.209	R
05T1152-121	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.383	R
05T1152-122	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	0.922	S
05T1152-123	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	0.056	S
05T1152-124	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.357	R
05T1152-125	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	0.117	S
05T1152-126	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.404	R
05T1152-127	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.126	R
05T1152-128	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.391	R
05T1152-129	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	0.222	S
05T1152-130	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	-0.005	R
05T1152-139	Sera Demre X 02P35	F <sub>2</sub>	0.012	R
05T1156-1	02P18 (Dolmalık Biber)	Dayanıksız Anaç	1.296	S

05T1156-2	02P18 (Dolmalık Biber)	Dayanıksız Anaç	öldü	S
05T1156-3	02P18 (Dolmalık Biber)	Dayanıksız Anaç	öldü	S
05T1156-4	02P18 (Dolmalık Biber)	Dayanıksız Anaç	0.883	S
05T1156-5	02P18 (Dolmalık Biber)	Dayanıksız Anaç	öldü	S
05T1158-1	C. annuum x C. furlescens (98-16-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.368	R
05T1158-3	C. annuum x C. furlescens (98-16-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.118	R
05T1158-4	C. annuum x C. furlescens (98-16-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.249	R
05T1158-5	C. annuum x C. furlescens (98-16-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.159	R
05T1158-6	C. annuum x C. furlescens (98-16-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.382	R
05T1158-7	C. annuum x C. furlescens (98-16-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.256	R
05T1158-8	C. annuum x C. furlescens (98-16-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.320	R
05T1158-9	C. annuum x C. furlescens (98-16-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.118	R
05T1159-1	C. annuum x C. furlescens (98-9-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.395	R
05T1159-2	C. annuum x C. furlescens (98-9-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.442	R
05T1159-3	C. annuum x C. furlescens (98-9-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.087	R
05T1159-4	C. annuum x C. furlescens (98-9-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.432	R
05T1159-5	C. annuum x C. furlescens (98-9-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.290	R
05T1159-6	C. annuum x C. furlescens (98-9-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	0.021	R
05T1159-7	C. annuum x C. furlescens (98-9-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.430	R
05T1159-8	C. annuum x C. furlescens (98-9-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.355	R
05T1159-9	C. annuum x C. furlescens (98-9-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.407	R
05T1159-10	C. annuum x C. furlescens (98-9-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.439	R
05T1159-11	C. annuum x C. furlescens (98-9-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.414	R
05T1159-12	C. annuum x C. furlescens (98-9-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.377	R
05T1159-13	C. annuum x C. furlescens (98-9-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	0.668	S
05T1159-14	C. annuum x C. furlescens (98-9-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.149	R

	furtescens (98-9-T-1)			
05T1159-15	C. annuum x C. furtescens (98-9-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	0.419	S
05T1159-16	C. annuum x C. furtescens (98-9-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.280	R
05T1159-17	C. annuum x C. furtescens (98-9-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.362	R
05T1160-1	C. annuum x C. furtescens (98-15-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.389	R
05T1160-2	C. annuum x C. furtescens (98-15-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	0.121	S
05T1160-4	C. annuum x C. furtescens (98-15-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.092	R
05T1160-5	C. annuum x C. furtescens (98-15-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	0.839	S
05T1160-6	C. annuum x C. furtescens (98-15-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.043	R
05T1160-7	C. annuum x C. furtescens (98-15-T-1)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.390	R
05T1161-1	C. annuum x C. furtescens (98-8-T-2)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.347	R
05T1161-2	C. annuum x C. furtescens (98-8-T-2)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.039	R
05T1161-3	C. annuum x C. furtescens (98-8-T-2)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.399	R
05T1161-4	C. annuum x C. furtescens (98-8-T-2)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.349	R
05T1163-1	C. annuum x C. furtescens (98-15-T-2)	TMV-R F <sub>8</sub>	0.037	R
05T1163-2	C. annuum x C. furtescens (98-15-T-2)	TMV-R F <sub>8</sub>	0.218	S
05T1163-3	C. annuum x C. furtescens (98-15-T-2)	TMV-R F <sub>8</sub>	0.089	S
05T1163-4	C. annuum x C. furtescens (98-15-T-2)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.330	R
05T1163-5	C. annuum x C. furtescens (98-15-T-2)	TMV-R F <sub>8</sub>	0.730	S
05T1163-6	C. annuum x C. furtescens (98-15-T-2)	TMV-R F <sub>8</sub>	-0.132	R

Tablo 10'te görüldüğü gibi TMV testlemeleri için oldukça ümitvar sonuçlar elde edilmiştir. Denemede dayanıksız kontrol olarak kullanılan Bağcı Çarliston ve Sera Demre çeşitleri virüsle infekte olmuş ve virüs replikasyonuna inoküle edilen yaprakların üzerindeki üst yapraklarda da belirlenmiştir. Dayanıklı F<sub>8</sub> hatlarının büyük çoğunluğu

testlemelerde dayanıklı bulunmuştur. Özellikle genom haritalama çalışmalarında kullanılmak üzere üzerinden populasyonlar geliştirilen 02P35 hattı TMV'ye dayanıklı bulunmuştur. Bağcı Çarliston X 02P35 F<sub>1</sub> melezlerinin tamamı testlemede dayanıklı bulunmuştur. Bu durum F<sub>8</sub> hattından gelen dayanıklılığın beklenildiği gibi dominant gen aksiyonuna sahip olduğunu işaret etmektedir. Bu çalışmalarla, projede materyal olarak kullanılan *C. frutescens*'ten türetilmiş F<sub>8</sub> hatlarında TMV dayanıklılığı doğrulanmış ve bu hatlarla Türk çeşitleri arasında yapılan melezlemeler sonucu oluşturulan F<sub>1</sub> ve F<sub>2</sub> populasyonlarında Türkiye'den toplanan TMV izolatına karşı dayanıklılık belirlenmiş ve Türk çeşitlerine aktarılmıştır. TMV dayanıklılığı biberde çok iyi çalışılmış ve dayanıklılık sağlayan gen biber genomunda 11. kromozom üzerinde haritalanmıştır. Biber'de TMV dayanıklılığı sağlayan gen *L* sembolüyle gösterilmektedir. Şu ana kadar bu genin dört değişik alleli belirlenmiştir. Bu çalışmada gen kaynağı olarak kullanılan *C. frutescens* L<sup>2</sup> alleleline sahip bulunmaktadır. *L* geninin bütün bu allelleri 11. kromozomda haritalanmıştır. Dolayısıyla, bu projede ayrıca bir haritalama yapmaya gerek kalmamıştır. Mevcut durumda, Türk çeşitlerine aktarılan TMV dayanıklılığının homozigot hale getirilmesi için F<sub>2</sub> populasyonları kendilenerek F<sub>6</sub> generasyonuna kadar ilerletilecektir. Şu anda F<sub>4</sub> bitkilerinin üretilmesi gerçekleştirilmektedir. Bu hatlar F<sub>6</sub> generasyonuna getirildiğinde *L* genini tanımlayan moleküler işaretleyiciler kullanılarak TMV dayanıklı F<sub>6</sub>-RIL hatlar seçilecektir. Paralel olarak bir generasyon geriye melezlenen populasyonlarda homozigotluğu sağlamak amacıyla altı generasyon kendilenerek BC<sub>1</sub>F<sub>6</sub> hatları elde edilecek ve benzer şekilde TMV tanımlayan işaretleyiciler kullanılarak dayanıklı bireyler belirlenecektir.

Eldeki populasyon ve hatların PVY dayanıklılığındaki kapasitesini belirlemek için yapılan testleme sonuçları Tablo 11'de özetlenmiştir.

Tablo 11. PVY ELISA sonuçları

Genotip	Test Edilen Bitki Sayısı	Materyallerin Pedigrisi	ELISA değeri (inoküle edilen yapraklar)	ELISA değeri (üst yapraklar)
06T49-1	3	<i>C. annuum</i> var. Perrenial	0.002	0.009
06T49-2			0.001	0.011
06T49-3			0.003	0.009
06T153-1	5	<i>C. annuum</i> var. Bağcı Çarliston	0.026	0.001

06T153-2			0.022	0.051
06T153-3			0.035	0.012
06T153-4			0.022	0.009
06T153-5			0.043	0.002
06T52-1	5	<i>C. chinense</i> PI159234-1	0.061	0.024
06T52-2			0.066	0.053
06T52-3			0.007	0.035
06T52-4			0.060	0.014
06T52-5			0.039	0.014
06T159-1	1	<i>C. annuum</i> var. California Wonder	1.375	2.007
06T152-1	20	<i>C. frutescens</i> (02P03) F <sub>8</sub>	1.302	0.435
06T152-2			0.961	2.459
06T152-3			0.657	2.350
06T152-4			1.847	0.033
06T152-5			1.568	0.008
06T152-6			0.554	0.005
06T152-7			1.967	2.125
06T152-8			1.658	0.869
06T152-9			1.918	2.313
06T152-10			0.397	0.087
06T152-11			1.131	0.015
06T152-12			1.189	0.028
06T152-13			1.998	2.469
06T152-14			2.331	2.431
06T152-15			1.873	2.517
06T152-16			2.049	2.158
06T152-17			1.912	2.589
06T152-18			0.280	0.318
06T152-19			1.842	2.386
06T152-20			2.185	0.034
		Tütün – Pozitif kontrol	1.840	2.646
		Tütün – Pozitif kontrol	2.561	2.796
		Tütün – Pozitif kontrol	0.97	2.266
		Tütün – Negatif kontrol	0.017	0.028
		Tütün – Negatif kontrol	0.015	0.028
		Tütün – Negatif kontrol	0.014	0.030
		<i>C. annuum</i> var. Bağcı Çarliston – negative kontrol	0.008	-0.010
		<i>C. annuum</i> var. Bağcı Çarliston – negative kontrol	0.003	-0.014

PVY testlemelerinde 1 yabancı tür (*C. chinense* PI159234-1), 1 F<sub>8</sub> ileri hat (*C. frutescens* (02P03) ve 3 adet kültür çeşiti (California Wonder, Perennial, Bağcı Çarliston) kullanılmıştır. Yabancı tür Cornell Üniversitesi biber ıslahçılarından Prof. Molly Jahn tarafından temin edilmiştir ve bu araştırmacılar tarafından bu hatta PVY dayanıklılığı olduğu rapor edilmiştir. Çalışmada kullanılan kültür çeşitleri PVY’ya tepkileri

bakımından değişik sonuçlar vermiştir. Küçük meyvelere sahip olan Perennial çeşiti aslında bir çok viral ve diğer hastalık etmenlerine dayanıklı bir çeşit olduğu bilinmekte ve bir çok çalışmada gen kaynağı olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada da PVY ile yapılan testlemelerde dayanıklılık bu hattan belirlenmiştir. PVY dayanıklılığı bakımından bize göre en ilginç sonuçlar *C. frutescens* (02P03) F<sub>8</sub> hattından elde edilmiştir. Tablo 11'tan da görülebileceği gibi bu hat PVY'a tepki bakımından açılım göstermektedir. Dayanıklı olarak belirlenen hatların inoküle edilen yapraklarında virüs replike olmuştur ancak üst yapraklarda virüse rastlanmamıştır. Bu hatlarda belliki dayanıklılık mekanizması mevcuttur. Bu mekanizma inoküle edilen yapraklarda replike olan virüsün üst yapraklara taşınmasını engellemektedir. Bu hat aynı zamanda CMV dayanıklılık çalışmasında da dayanıklılık kaynağı olarak kullanılmaktadır. Böylece bu hatta CMV ve TMV dayanıklılığından sonra PVY dayanıklılığında bu çalışma ile bu hatta belirlenmiştir. CMV dayanıklılık genlerinin haritalanmasında kullanılacak populasyonlar Tablo 12'da verilmiştir.

Tablo 12. CMV haritalamasında kullanılacak populasyonlar.

06T44	02.03.2006	20	<i>C. frutescens</i> CMV	14.6.1.9
06T45	02.03.2006	20	<i>C. frutescens</i> CMV - F <sub>1</sub>	14.6.1.9 x Jupiter - F <sub>1</sub>
06T46	02.03.2006	20	<i>C. annuum</i>	Jupiter
06T47	02.03.2006	150	<i>C. frutescens</i> CMV - F <sub>2</sub>	14.6.1.9 x Jupiter - F <sub>2</sub>
06T48	02.03.2006	150	<i>C. frutescens</i> CMV - F <sub>2</sub>	14.6.1.9 x Jupiter - F <sub>2</sub>
06T49	02.03.2006	20	<i>C. annuum</i>	Perennial
06T50	02.03.2006	20	<i>C. frutescens</i> CMV - F <sub>1</sub>	14.6.1.9 x Perennial-F <sub>1</sub>
06T51	02.03.2006	150	<i>C. frutescens</i> CMV - F <sub>2</sub>	14.6.1.7 x Perennial -F <sub>2</sub>
06T150	02.03.2006	150	<i>C. frutescens</i> - F <sub>2</sub>	02P19 x 02P03
06T151	02.03.2006	100	<i>C. frutescens</i> - BC <sub>1</sub>	02P19 X 04T423 (02P19x02P03)
06T152	02.03.2006	50	<i>C. frutescens</i> - F <sub>8</sub>	02P03
06T153	02.03.2006	100	<i>C. annuum</i>	Bağcı Charlston

Haritalama çalışmalarında 06T48 pedigree numaralı populasyona (*C. frutescens* 14.6.1.9 x *C. annuum* var. Jupiter) ait 75 F<sub>2</sub> bitkisi kullanılmıştır. Fenotipik analizler için ise bu 75 F<sub>2</sub> bitkisinin kendilenmesinden türetilen F<sub>2:3</sub> hatları kullanılmıştır. Her bir F<sub>2:3</sub> hattını temsil eden en az 10 bitki tek tek CMV virüsü ile inoküle edilmiştir. Elde edilen ELISA değerleri tek tek elde edilmiş ve analizlerde kullanılmak üzere ortalamaları alınmıştır. F<sub>2</sub> populasyonundan gelen genotipik veriler ve F<sub>3</sub> populasyonlarından gelen fenotipik verilerin Qgene bilgisayar programı ile

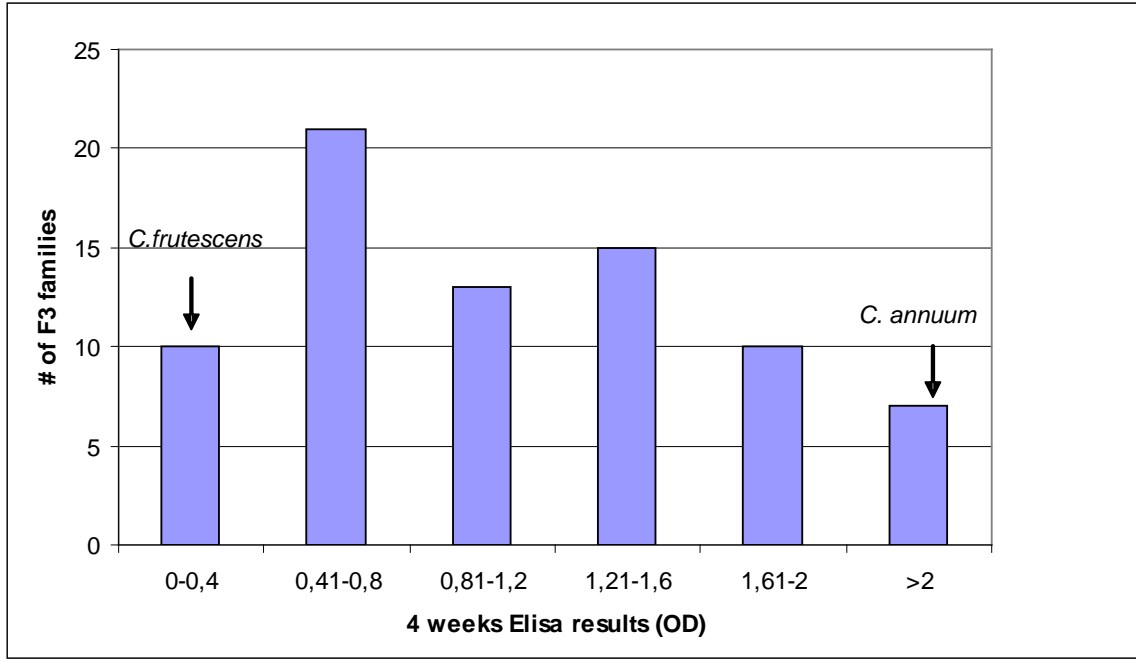


ilişkilendirilmesi sonucu CMV'ye dayanıklılıkta rol oynayan genlerin biber genomundaki yerleri ve bu genlerle bağlantılı olan işaretleyiciler belirlenmiştir.

Bu amaç için *C. annuum* cv. Jupiter x *C. frutescens* 14.6.1.9 melezlemede türetilen 75 F<sub>2</sub> bitkisine ait F<sub>3</sub> aileleri (her birinden en az 10 adet bitki) dört yapraklı devreye geldiklerinde CMV –Fny izolatu ile inoküle edilmişlerdir. F<sub>3</sub> ailelerine ilaveten, Jupiter ve dayanıklı anaç *C. frutescens* 14.6.1.9 kontrol olarak inoküler edilmiştir. Böylece, toplam 1066 bitki CMV'ye tepkileri için testlenmeye alınmıştır. ELISA analizleri inokülasyondan iki hafta sonra inoküle edilen yapraklarda ve dört ve sekiz hafta sonra inoküle edilmeyen üst yapraklardan alınan yaprak örneklerinde uygulanmıştır. Ayrıca, bitkiler inokülasyondan sekiz hafta sonra görsel olarak hastalık simptom gelişimi skorlanmıştır. Bu testleme sonuçları Tablo 13'de verilmiştir. Genelde, inoküle edilen yaprakların ELISA değerleri inokülasyonun başarılı olduğunu ve bu yapraklarda virüs olduğunu göstermektedir. Ancak, inokülasyondan iki hafta sonra bazı durumlarda inoküle edilen yapraklarda düşük ELISA değerleri elde edilmiştir. Örneğin, F<sub>3</sub> ailesi 48-7 ve 48-16 nolu hatlar bu duruma örnektir (Tablo 13). Bu durum muhtemelen bu yapraklarda inokülasyonun iyi yapılamadığını göstermektedir. Eğer inokülasyon bu şekilde başarısız olmuşsa genelde beklenen ileri dönemlerde inoküle edilmeyen üst yapraklarda yapılacak ELISA testlemelerinde de düşük düzeyde ELISA değerleri elde edilecektir. Ancak, bu durum bu iki F<sub>3</sub> hattı için bu şekilde olmamıştır. Dört ve sekizinci hafta ELISA analizlerinde 48-7 ve 48-16 nolu F<sub>3</sub> ailesine ait bitkilerde virüs belirlenmiştir (Tablo 13). Bu duruma yönelik ikinci açıklama ise inokülasyon başarılı olmuştur fakat virüs inoküle edilen yapraklarda artık mevcut değildir. Bu açıklama daha muhtemel görünmektedir. Çünkü, inokülasyondan sonra inoküle edilen yapraklar bazen dökülmekte veya bazende test yapılmadan önce ölmektedir. Sonuç olarak, çok az miktarda yaprak özsuyu elde edilebilmekte ve bu tip örneklerden yapılan ELISA değerleri düşük çıkabilmektedir.

İnokülasyondan dört hafta sonra, virüs bitki dokularında çoğalmıştır ve inoküle edilmeyen üst yapraklara doğru taşınmıştır (cell to cell movement). Bu devrede, F<sub>3</sub> bireylerinin ELISA analizleri bazı bitkilerin tamamen dayanıklı ve virüsten temiz olduğunu gösterirken diğer bazı bireylerin inoküle edilmeyen üst yapraklarında üç değerinden daha yüksek ELISA değerli çok yüksek CMV titerleri verdiğini göstermiştir. Ortalama ELISA değerleri (>0.2 duyarlılığı göstermektedir) her bir F<sub>3</sub> ailesi için hesaplanmıştır ve aileyi oluşturan bireyler ELISA değerlerine göre dayanıklı

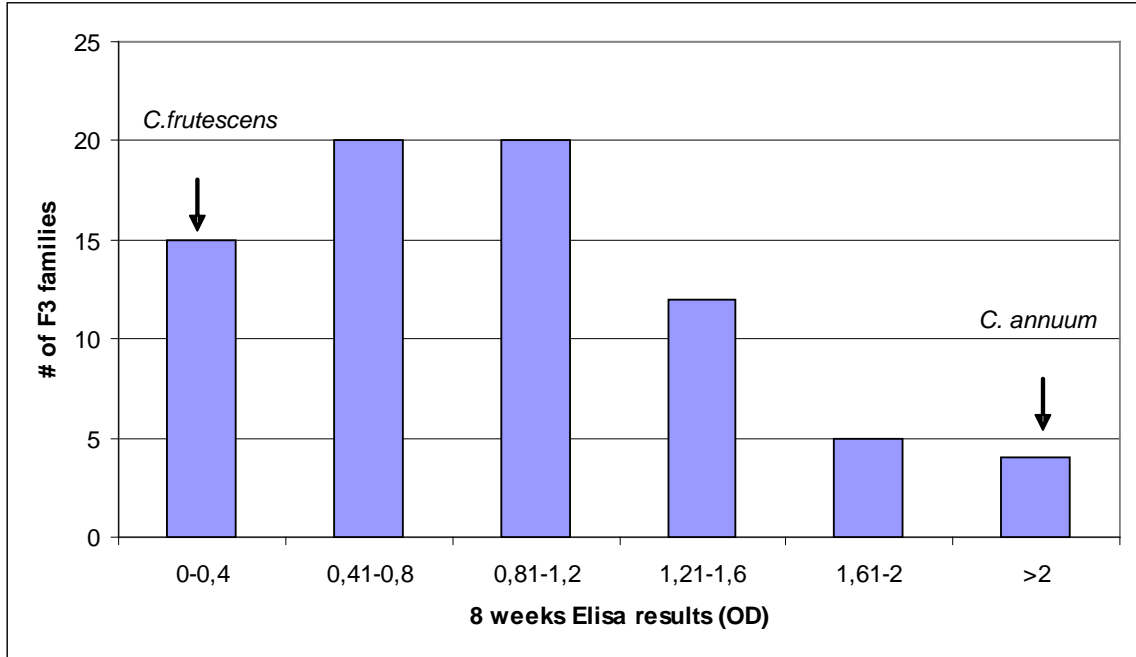
yada duyarlı olarak karakterize edilmişlerdir (Tablo 13). Genelde, F<sub>3</sub> aileleri virüs dayanıklılığı bakımından açılım göstermiştir ve aileyi oluşturan bireyler içerisinde dayanıklı bitkilerin olduğu gibi duyarlı bitkilerde bulunmuştur. Bununla birlikte, bazı F<sub>3</sub> ailesi bitkileri (örneğin, 48-42 ve 48-43 nole F<sub>3</sub> ailesi bitkileri) inokülasyondan dört hafta sonra tamamen duyarlı hale gelmiştir. Bu devrede (dört hafta sonra) ortalama ELISA değerlerinin dağılım histogramından elde edilen ELISA değerlerinin normal dağılım göstermediğini ve 10 F<sub>3</sub> ailesi (%13) ortalama ELISA değerlerinin *C. frutescens* dayanıklı bireylerinden daha düşük yada yakın değerler göstermiştir (Şekil 3).



Şekil 3. İnokülasyondan dört hafta sonra inoküle edilmeyen üst yaprakların ELISA sonuçları. Ok işareti iki anacın ortalama ELISA değerlerini göstermektedir.

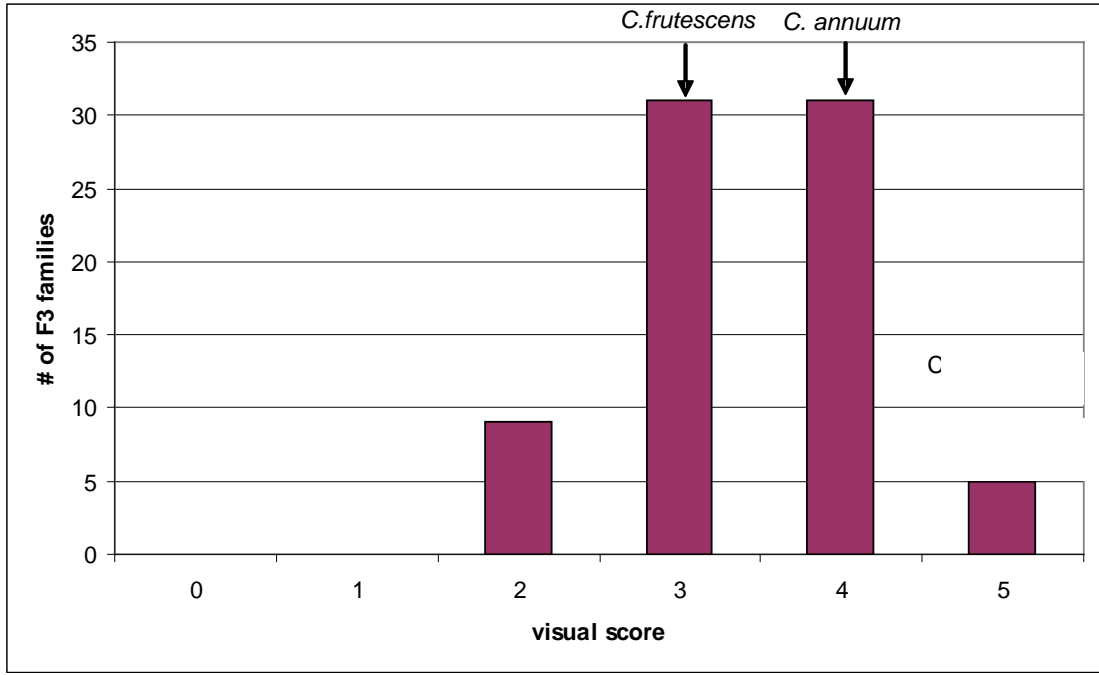
CMV ile inokülasyondan sekiz hafta sonra inoküle edilmeyen üst yapraklarda elde edilen ELISA değerleri Tablo 11’ de de görüldüğü gibi dördüncü haftada elde edilen ELISA değerleri ile çok benzer bulunmuştur. Ayrıca, dördüncü ve sekizinci hafta ELISA değerleri arasında önemli pozitif korelasyon görülmüştür ( $r = 0.94$ ,  $p < 0.0001$ ). Dayanıklı ve duyarlı bitki sayısı da benzerlik göstermektedir ancak bazı durumlarda daha çok dayanıklı bitki inokülasyondan sonra sekizinci haftada gözlenmiştir. Bu sonuçlar bitki dayanıklılık mekanizmasının bu bitkilerde daha yavaş aktif hale geldiğini göstermektedir veya bitkiler bir şekilde virüs replikasyonundan ve taşınmasından daha hızlı bir büyüme göstermektedir. Sekizinci hafta ortalama ELISA değerleri dağılım histogramı dayanıklı anaca doğru bir eğilim göstermektedir. 15 F<sub>3</sub> (%20) bitkisinin

ortalama ELISA değerleri *C. frutescens* dayanıklı bireylerinden daha düşük yada yakın değerler göstermiştir (Şekil 4).



Şekil 4. İnokülasyondan sekiz hafta sonra inoküle edilmeyen üst yaprakların ELISA sonuçları. Ok işareti iki anacın ortalama ELISA değerlerini göstermektedir.

Bitkiler inokülasyondan sekiz hafta sonra virüs simptom gelişimi bakımından tayin edilmiş ve görsel bir skorlama verilmiştir (1-5 skalası). ELISA değerlerinin kullanıldığı sonuçlar ile kıyaslandığında daha fazla sayıda bitki duyarlı olarak sınıflandırılmıştır (Tablo 11). Bu durum muhtemelen besin stresi ve diğer fizyolojik şartların virüs hastalık simptomları ile karıştırılmasından kaynaklanmaktadır. Bunun bir sonucu olarak, görsel skorlama ile ELISA değerleri arasında nisbi olarak zayıf bir korelasyon belirlenmiştir ( $r=0.48$ ,  $p<0.0001$ ) ve görsel skorlama için oluşturulan dağılım histogramı ELISA değerleri için oluşturulandan oldukça farklı görünmüştür (Şekil 5).



Şekil 5. F<sub>3</sub> bitkilerinin görsel skorlarının dağılım histogramı

Tablo 13. İnokülasyondan iki hafta sonra inoküle edilen, dört ve sekiz hafta sonra inoküle edilmeyen üst yaprakların ortalama ELISA sonuçları ve görsel skorların ortalama değerleri

Hatlar	2. Hafta ELISA (± SE)	4. hafta ELISA (± SE)	Dayanıklı (R) /Duyarlı (S)	8. hafta ELISA (± SE)	Dayanıklı (R) /Duyarlı (S)	Görsel skorlama (± SE)	Dayanıklı (R) /Duyarlı (S)
48-1	0,223 ± 0,03	0,716 ± 0,27	12R:6S	0,589 ± 0,25	12R:6S	2,722 ± 0,28	2R:16S
48-2	0,933 ± 0,32	2,587 ± 0,34	0R:9S	2,601 ± 0,40	1R:8S	4 ± 0,33	0R:9S
48-4	0,826 ± 0,21	1,80 ± 0,29	3R:15S	1,245 ± 0,32	5R:13S	2,611 ± 0,28	3R:15S
48-5	0,412 ± 0,17	2,947 ± 0,20	1R:17S	2,980 ± 0,25	1R:17S	4,705 ± 0,14	0R:18S
48-6	0,331 ± 0,09	0,600 ± 0,16	11R:6S	0,483 ± 0,16	11R:6S	3,823 ± 0,23	0R:17S
48-7	0,089 ± 0,03	0,995 ± 0,24	1R:6S	0,896 ± 0,28	1R:6S	4,571 ± 0,20	0R:7S
48-8	0,366 ± 0,06	2,008 ± 0,28	2R:12S	1,685 ± 0,31	2R:12S	3,285 ± 0,28	0R:14S
48-10	0,263 ± 0,02	0,688 ± 0,25	10R:8S	0,628 ± 0,26	12R:6S	3,777 ± 0,13	0R:18S
48-11	0,402 ± 0,08	2,325 ± 0,33	0R:7S	1,481 ± 0,24	0R:7S	3,142 ± 0,70	2R:5S
48-14	0,393 ± 0,14	1,428 ± 0,30	4R:12S	1,133 ± 0,28	4R:12S	2,875 ± 0,27	1R:15S
48-15	0,197 ± 0,03	0,710 ± 0,25	11R:7S	0,644 ± 0,27	14R:4S	2,722 ± 0,32	3R:15S
48-16	0,053 ± 0,01	0,956 ± 0,36	10R:4S	0,913 ± 0,37	10R:4S	3,285 ± 0,32	0R:14S
48-17	0,047 ± 0,01	0,542 ± 0,41	6R:1S	0,487 ± 0,42	6R:1S	2,428 ± 0,57	2R:5S
48-19	0,163 ± 0,02	3,252 ± 0,06	0R:2S	3,103 ± 0,01	0R:2S	3 ± 0,01	0R:2S
48-20	1,083 ± 0,48	2,349 ± 0,30	0R:6S	1,493 ± 0,38	0R:6S	4 ± 0,25	0R:6S
48-21	0,329 ± 0,13	1,498 ± 0,33	7R:11S	1,374 ± 0,33	8R:11S	4,111 ± 0,17	0R:18S
48-22	0,386 ± 0,08	1,323 ± 0,48	2R:6S	1,014 ± 0,44	3R:5S	3,571 ± 0,36	0R:8S
48-23	0,283 ± 0,10	1,464 ± 0,31	4R:12S	1,397 ± 0,32	4R:12S	3,5 ± 0,31	1R:15S
48-24	0,347 ± 0,15	1,473 ± 0,21	4R:14S	1,473 ± 0,21	4R:14S	4,111 ± 0,25	0R:18S
48-25	0,177 ± 0,03	0,809 ± 0,28	11R:7S	0,809 ± 0,28	11R:7S	3,277 ± 0,26	1R:17S
48-27	0,130 ± 0,01	0,281 ± 0,17	14R:3S	0,281 ± 0,17	14R:3S	2,411 ± 0,31	4R:13S
48-29	0,120 ± 0,01	0,431 ± 0,22	13R:5S	0,431 ± 0,22	13R:5S	2,666 ± 0,24	1R:17S
48-30	0,161 ± 0,03	0,019 ± 0,02	2R:0S	0,019 ± 0,02	2R:0S	3 ± 0,01	0R:2S
48-31	0,177 ± 0,02	0,412 ± 0,21	12R:4S	0,412 ± 0,21	12R:4S	2,75 ± 0,23	1R:15S
48-32	0,642 ± 0,17	1,264 ± 0,28	4R:14S	0,828 ± 0,21	4R:14S	2,444 ± 0,31	6R:12S
48-34	0,694 ± 0,20	1,498 ± 0,30	3R:12S	1,145 ± 0,31	5R:10S	3,266 ± 0,34	1R:14S

48-35	1,191 ± 0,43	2,943 ± 0,15	0R:5S	2,443 ± 0,52	0R:5S	4,6 ± 0,24	0R:5S
48-36	0,480 ± 0,14	0,900 ± 0,23	6R:12S	0,469 ± 0,18	10R:8S	2,166 ± 0,37	6R:12S
48-37	0,271 ± 0,05	0,886 ± 0,40	8R:3S	0,839 ± 0,41	8R:3S	3,909 ± 0,31	0R:11S
48-38	0,202 ± 0,02	0,328 ± 0,16	14R:4S	0,237 ± 0,16	16R:2S	2,277 ± 0,22	3R:15S
48-40	0,283 ± 0,08	0,422 ± 0,22	15R:3S	0,350 ± 0,22	16R:2S	2,833 ± 0,23	1R:17S
48-41	0,124 ± 0,02	0,531 ± 0,16	1R:17S	0,247 ± 0,16	16R:2S	3,833 ± 0,12	0R:18S
48-42	0,321 ± 0,08	0,391 ± 0,10	0R:18S	0,159 ± 0,11	17R:1S	2,555 ± 0,21	3R:15S
48-43	0,153 ± 0,04	1,771 ± 32	0R:18S	1,673 ± 0,35	10R:8S	4,444 ± 0,16	0R:18S
48-45	0,803 ± 0,22	1,960 ± 0,35	0R:18S	1,163 ± 0,27	7R:11S	1,944 ± 0,24	6R:12S
48-46	0,194 ± 0,05	1,518 ± 0,26	0R:18S	1,347 ± 0,30	8R:10S	3,888 ± 0,29	0R:18S
48-47	0,567 ± 0,19	1,919 ± 0,27	0R:17S	1,185 ± 0,27	3R:14S	3,058 ± 0,38	2R:15S
48-48	0,365 ± 0,12	1,693 ± 0,35	1R:12S	1,347 ± 0,34	2R:11S	3,153 ± 0,33	0R:13S
48-49	0,170 ± 0,05	0,557 ± 0,28	12R:4S	0,557 ± 0,28	12R:4S	2,625 ± 0,27	2R:14S
48-50	0,119 ± 0,06	0,797 ± 0,37	8R:4S	0,797 ± 0,37	8R:4S	3,083 ± 0,33	0R:12S
48-51	0,132 ± 0,03	0,555 ± 0,29	9R:3S	0,555 ± 0,29	9R:3S	3 ± 0,40	2R:10S
48-52	0,197 ± 0,04	1 ± 0,24	8R:10S	1 ± 0,24	8R:10S	3,277 ± 0,33	1R:17S
48-55	0,179 ± 0,07	0,292 ± 0,17	13R:3S	0,292 ± 0,17	13R:3S	2,75 ± 0,23	1R:17S
48-56	0,442 ± 0,15	1,909 ± 0,19	1R:17S	1,909 ± 0,19	1R:17S	3,888 ± 0,42	3R:15S
48-57	0,908 ± 0,40	1,560 ± 0,32	2R:7S	1,560 ± 0,32	2R:7S	3,777 ± 0,40	0R:9S
48-59	0,254 ± 0,08	1,289 ± 0,28	3R:15S	1,133 ± 0,27	5R:13S	2,888 ± 0,22	1R:17S
48-60	0,101 ± 0,01	0,481 ± 0,18	11R:4S	0,314 ± 0,17	12R:3S	3,533 ± 0,21	0R:15S
48-61	0,108 ± 0,01	1 ± 0,32	4R:9S	0,803 ± 0,32	9R:4S	2,384 ± 0,43	5R:8S
48-65	0,346 ± 0,27	0,381 ± 0,20	6R:3S	0,162 ± 0,07	6R:3S	2,444 ± 0,24	1R:8S
48-66	0,614 ± 0,21	1,178 ± 0,28	5R:13S	0,816 ± 0,28	10R:8S	3,777 ± 0,15	0R:18S
48-67	0,270 ± 0,11	1,838 ± 0,50	2R:5S	1,701 ± 0,55	2R:5S	4,285 ± 0,36	0R:7S
48-68	0,992 ± 0,24	1,914 ± 0,28	3R:15S	1,554 ± 0,26	3R:15S	2,944 ± 0,31	2R:16S
48-70	0,120 ± 0,01	0,606 ± 0,29	13R:3S	0,559 ± 0,28	13R:3S	3,25 ± 0,28	1R:15S
48-73	0,475 ± 0,20	0,425 ± 0,21	8R:6S	0,328 ± 0,21	11R:3S	2,714 ± 0,28	1R:13S
48-74	0,499 ± 0,16	0,382 ± 0,19	14R:4S	0,303 ± 0,15	14R:4S	3,555 ± 0,16	0R:18S
48-81	0,329 ± 0,10	0,909 ± 0,29	8R:8S	0,469 ± 0,19	9R:7S	3,25 ± 0,21	1R:16S
48-83	0,215 ± 0,10	0,478 ± 0,24	14R:3S	0,277 ± 0,16	15R:2S	3,294 ± 0,16	0R:17S
48-84	0,438 ± 0,20	0,627 ± 0,21	11R:7S	0,573 ± 0,22	13R:5S	3,611 ± 0,20	0R:18S

48-87	0,280 ± 0,10	1,707 ± 0,19	1R:13S	1,693 ± 0,20	2R:12S	4,642 ± 0,19	0R:14S
48-88	0,436 ± 0,17	0,605 ± 0,19	12R:6S	0,506 ± 0,20	12R:6S	3,888 ± 0,17	0R:18S
48-89	0,518 ± 0,18	1,487 ± 0,36	2R:5S	1,470 ± 0,37	2R:5S	4,428 ± 0,36	0R:7S
48-90	0,382 ± 0,35	0,912 ± 0,40	4R:3S	0,899 ± 0,41	4R:3S	4,285 ± 0,28	0R:7S
48-92	0,093 ± 0,06	1,114 ± 0,25	7R:8S	1,032 ± 0,26	7R:8S	4,133 ± 0,23	0R:15S
48-93	0,027 ± 0,01	0,318 ± 0,24	7R:1S	0,28 ± 0,25	7R:1S	1,625 ± 0,53	5R:3S
48-100	0,050 ± 0,03	1,062 ± 0,24	9R:9S	1,048 ± 0,24	9R:9S	4,5 ± 0,12	0R:18S
48-102	0,019 ± 0,01	0,062 ± 0,01	3R:0S	0,029 ± 0,01	3R:0S	3,666 ± 0,33	0R:3S
48-103	0,355 ± 0,16	1,818 ± 0,32	3R:12S	1,065 ± 0,25	12R:3S	4,066 ± 0,11	0R:15S
48-104	0,049 ± 0,03	1,300 ± 0,66	2R:3S	0,929 ± 0,57	3R:2S	4 ± 0,31	0R:5S
48-105	0,076 ± 0,01	0,550 ± 0,47	5R:1S	0,521 ± 0,47	5R:1S	3,666 ± 0,42	0R:6S
48-111	0,134 ± 0,08	0,586 ± 0,26	13R:4S	0,546 ± 0,27	13R:4S	3,529 ± 0,21	0R:17S
48-115	0,031 ± 0,01	0,023 ± 0,01	4R:0S	0,041 ± 0,01	4R:0S	2,5 ± 0,64	1R:3S
48-116	0,105 ± 0,06	1,462 ± 0,31	7R:10S	1,390 ± 0,30	7R:10S	4,352 ± 0,17	0R:17S
48-118	0,434 ± 0,22	1,311 ± 0,31	4R:8S	1,200 ± 0,34	6R:6S	4,083 ± 0,35	1R:11S
48-119	0,216 ± 0,10	1,245 ± 0,30	5R:9S	0,762 ± 0,26	7R:7S	3,714 ± 0,26	0R:14S
48-123	0,259 ± 0,11	1,079 ± 0,31	7R:10S	0,900 ± 0,32	9R:8S	3,235 ± 0,27	0R:17S
48-128	0,019 ± 0,02	0,705 ± 0,30	11R:4S	0,618 ± 0,29	11R:4S	3,2 ± 0,31	0R:15S

## 4.2. Kalıtım

F<sub>3</sub> bireylerinin virüs testleme sonuçları biber’de virüs dayanıklılığının kantitatif bir karakter olduğunu ve hastalığa tepki bakımından bireyler arasında tamamen dayanıklı bireylerin olduğu gibi tamamen duyarlı bireylerinde bulunduğunu göstermiştir. Bu durum inoküle edilmeyen üst yapraklar için elde edilen ELISA değerlerinin 0 ile 3 arasında değişmesinden de görülmektedir. Kantitatif karakterlerin diğer bir özelliği normal dağılım göstermesidir. Bu çalışmada, CMV’ye tepki değerleri normal dağılım göstermektedir (Şekil 3, 4). ELISA değerleri, aile düzeyinde incelendiğinde, beklenenden daha çok sayıda dayanıklı bitki olduğu için, bir yada iki major genin dayanıklılıkta rol oynadığı düşünülmektedir (Şekil 3, 4). Dolayısıyla, bu sonuçlar biber de CMV dayanıklılık genlerinin belirlenmesi için QTL haritalamasının en iyi yaklaşım olduğunu ortaya koymuştur.

## 4.3. Moleküler Analiz

CMV dayanıklılığında rol oynayan genlerin belirlenmesi için, 75 bitkiden oluşan bir F<sub>2</sub> popülasyonu kullanılmıştır. Bu hatlar *C. annuum* cv. Jupiter ve *C. frutescens* 14.6.1.9 hatlarının melezlenmesinden elde edilmiştir. Toplam olarak 13 AFLP primer kombinasyonu, 144 SSR ve 287 CoII CAP işaretleyicisi polimorfizm için testlenmiştir.

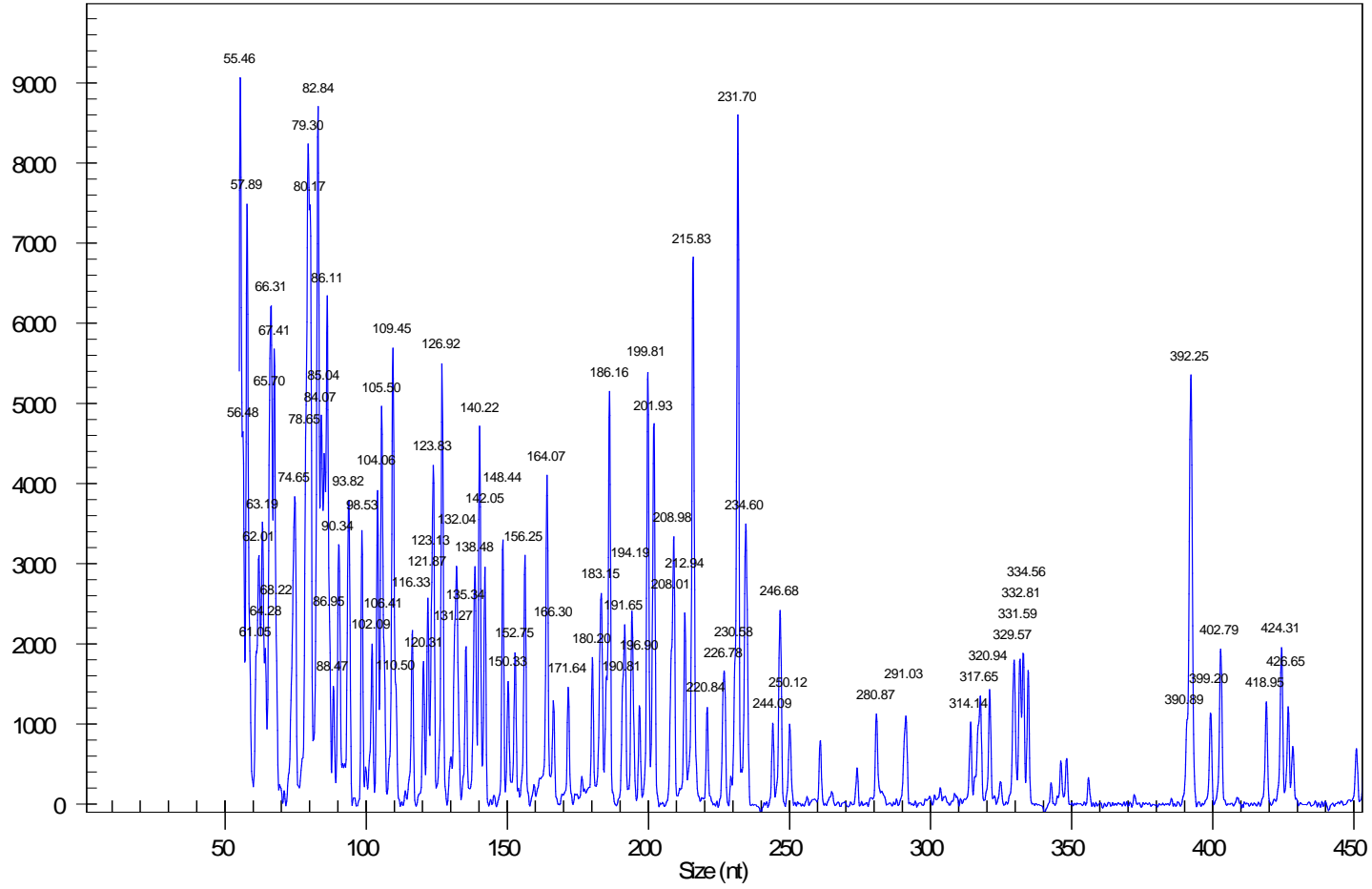
### 4.3.1. AFLP (Çoğaltılmış Parçacık Uzunluk Polimorfizm)

Bu çalışmada, 13 AFLP primer kombinasyonu kullanılmıştır (Tablo 11). Bu parçacıkların bazılarına ait temsili resimler Şekil 6, 7, 8’de verilmiştir. AFLP sisteminin yeniden üretilebilirliğinin kontrol edilmesi için, büyüklük standartları için overlay grafikleri yapılmıştır ve beklenen büyüklük standartları ile üst üste gelmeyen parçacıklara sahip örnekler analizlerden çıkarılmıştır (Şekil 7). 13 primer kombinasyonu için toplam olarak 2095 band çoğaltılmıştır. E-ACC/M-CAC primer kombinasyonu en az bandı (78 band) verirken E-ACT/M-CTA kombinasyonu ise 298 bandla en çok band üreten primer kombinasyonu olmuştur. Bu bandlar içerisinde 480 adedi polimorfik bulunmuştur (Tablo 11). Primer kombinasyonu başına polimorfik bandların sayısı 10 (E-ACC/M-CAC primer kombinasyonu için)’dan 62 (E-ACT/M-CTA primer kombinasyonu için)’ye kadar değişiklik göstermiştir. E-ACC/M-CTA primer kombinasyonu 8.5% ile en düşük polimorfizm oranı verirken E-ACT/M-CAG ve E-AAC/M-CTG primer kombinasyonları, sırasıyla, %37.7 ve %35.0 ile en yüksek polimorfizm oranlarına sahip olmuşlardır. Bütün primer kombinasyonları için ortalama

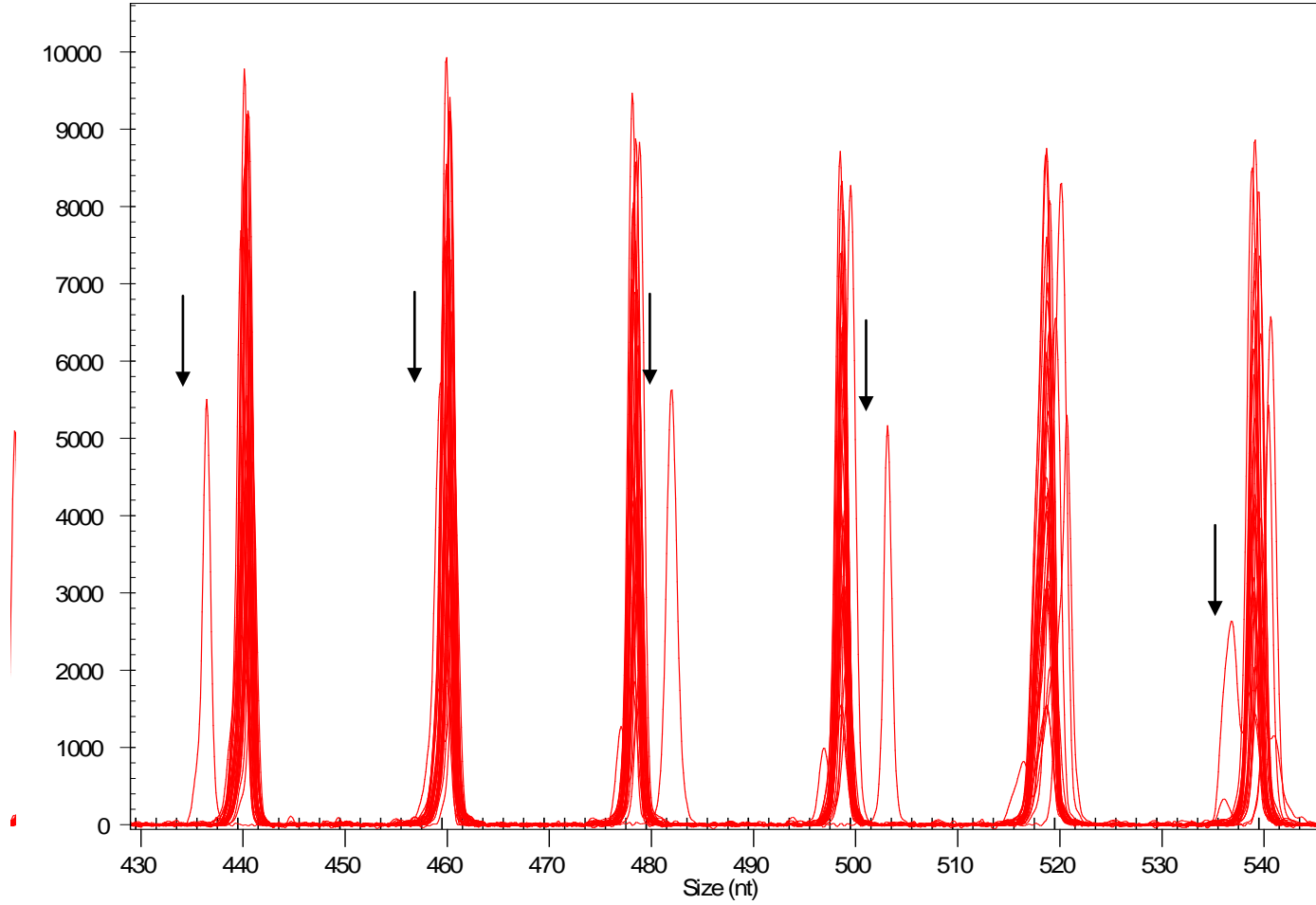


polimorfizm oranı %24.4'tür. Test edilen 13 primer kombinasyonundan 12'sinde, bandların çoğunluğu *C. annuum*'a özgündür. Toplam olarak, 297 (%64.3) *C. annuum* özgün ve 183 (%35.7) *C. frutescens* özgün band belirlenmiştir. Anaçlarda polimorfik bulunan ancak F<sub>2</sub> populasyonunda açılım göstermeyen 16 adet band analizlerden çıkarılmıştır. Böylece, 464 AFLP işaretleyicisi QTL analizleri için kullanılmıştır. Chi square goodness-of-fit analizi bu işaretleyicilerden %33.4 (155 adet)'ünün F<sub>2</sub> populasyonunda dominant bir işaretleyiciden beklenen 3:1 açılımını göstermiştir. Bu açılıma uymayan işaretleyicilerin sayısı biber için yapılan diğer AFLP çalışmalarından görüldüğü kadarıyla daha fazla sayıda bulunmuştur (KANG ve ark. 2001, LEE ve KIM 2003).

## 44.A01\_07101909JM

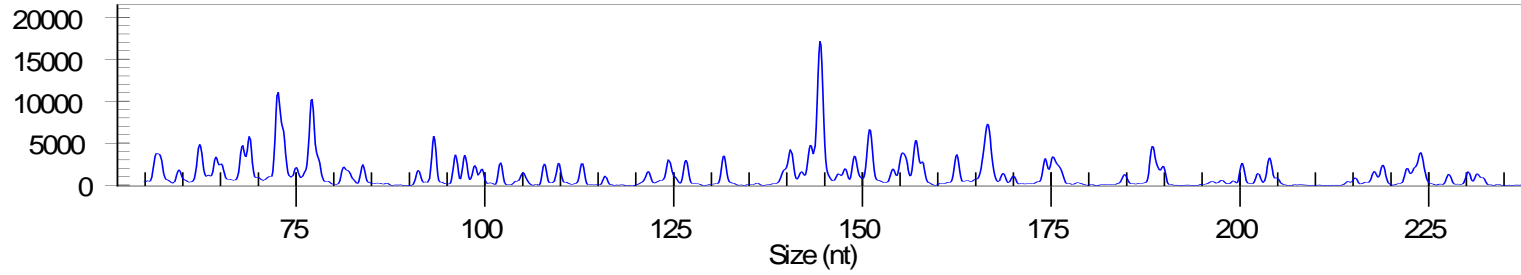


Şekil 6. E-ACT/M-CAG primer kombinasyonu için elde edilen bir AFLP grafiği örneği. Her bir sinyal amplifikasyon edilmiş bir parçacığı temsil etmektedir. Parçacıkların büyüklükleri her bir sinyalin üzerinde verilmiştir.

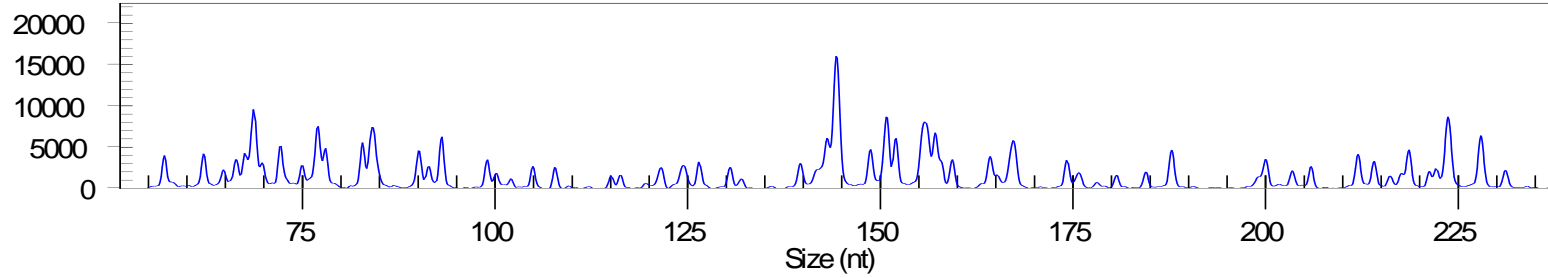


Şekil 7. Overlay grafiği bir primer kombinasyonunda kullanılan 75 örnek için standart büyüklüklerinin üst üste gelmesini göstermektedir. Oklar beklenen büyüklükte üst üste gelmeyen parçacıkları göstermektedir. Bu tip parçacıklara sahip örnekler analizden çıkarılmıştır.

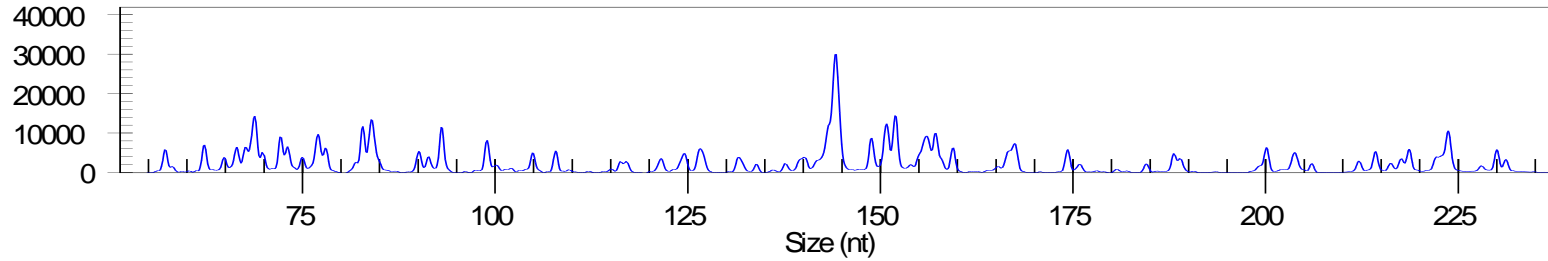
44.A01\_07110109E6



46.B01\_07110109E8



4.E01\_07110109EB



Şekil 8. E-AGG/M-CTA primer kombinasyonu için üç örneğin AFLP sonuçlarının gösterildiği stacked grafiği (44-*C. annuum* cv. Jupiter; 46-*C. frutescens*; 4-F<sub>2</sub> bireyi)

Tablo 14. Her bir AFLP primer kombinasyonu için çoğalan ve polimorfik bulunan lokusların sayısı. Polimorfik bandların hangi anaca ait olduğu ayrıca verilmiştir.

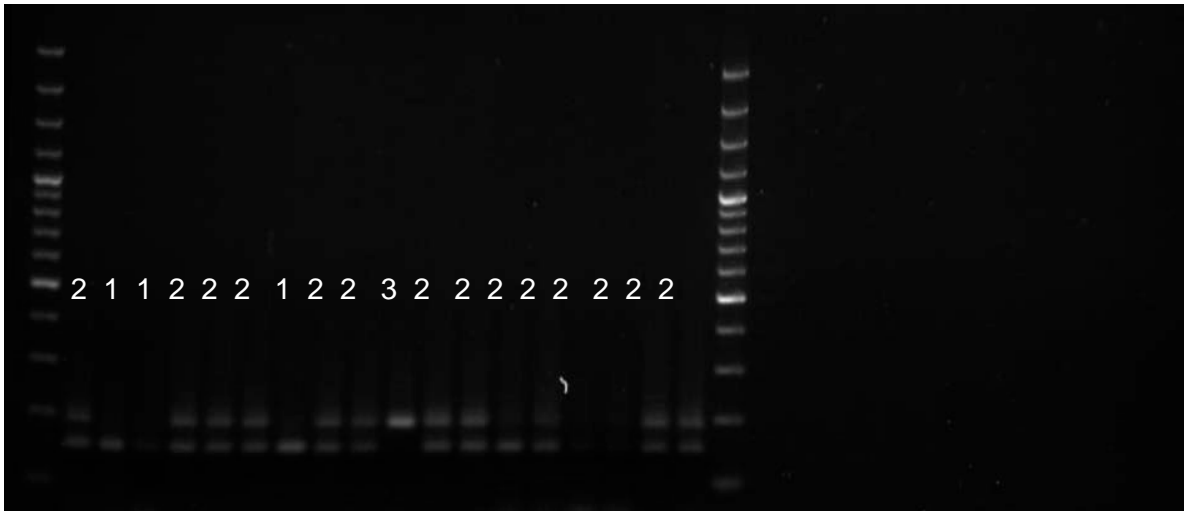
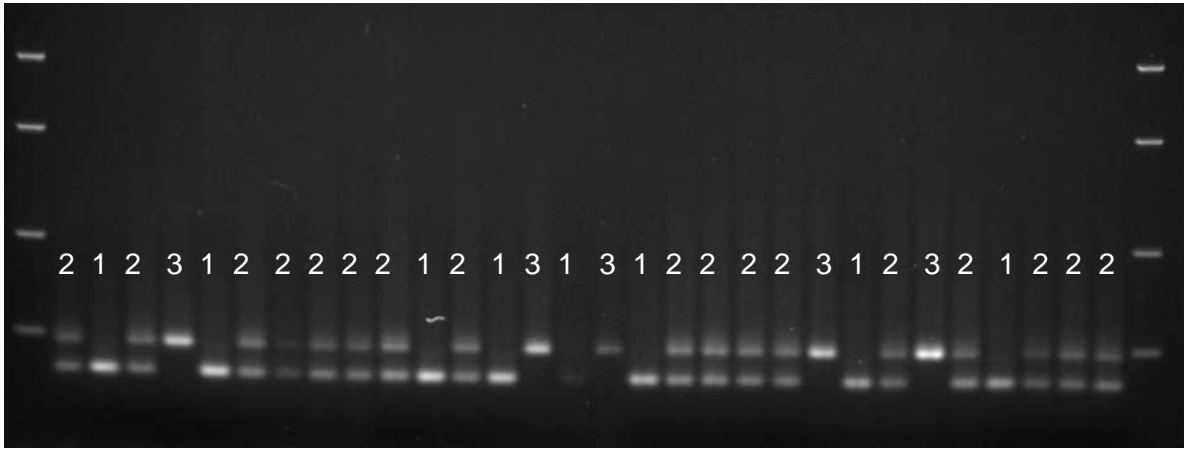
EcoRI primeri	MseI primeri	Toplam band sayısı	Polimorfik bandların sayısı (%)	<i>Capsicum annuum</i> 'a ait bandların sayısı (%)	<i>Capsicum frutescens</i> 'e ait bandların sayısı (%)
E AAC	M CAC	185	49 (26.5%)	28 (57.1%)	21 (42.9%)
E AAC	M CTG	140	49 (35.0%)	46 (93.9%)	3 (6.1%)
E ACC	M CAA	149	47 (31.5%)	15 (31.9%)	32 (68.1%)
E ACC	M CAC	78	10 (12.8%)	8 (80.0%)	2 (20.0%)
E ACC	M CTA	259	22 (8.5%)	13 (59.1%)	9 (40.9%)
E ACT	M CAG	130	49 (37.7%)	27 (55.1%)	22 (44.9%)
E ACT	M CTA	298	62 (20.8%)	41 (66.1%)	21 (33.9%)
E ACT	M CTG	154	44 (28.6%)	24 (54.5%)	20 (45.5%)
E AGC	M CAA	160	33 (20.6%)	18 (54.5%)	15 (45.5%)
E AGC	M CAT	134	34 (25.4%)	27 (79.4%)	7 (20.6%)
E AGC	M CTC	177	47 (26.5%)	24 (51.1%)	23 (48.9%)
E AGG	M CAA	97	17 (17.5%)	15 (88.2%)	2 (11.8%)
E AGG	M CTA	134	17 (12.7%)	11 (64.7%)	6 (35.3%)

#### 4.3.2. SSR işaretleyicileri (Mikrosatellit)

Toplam 144 Hpms (LEE ve ark., 2004), 29 adet TC (TIGR) ve 26 domates SSR (FRARY ve ark., 2005) SSR işaretleyicisi haritalama popülasyonunun anaçları olan *C. annuum* cv. Jupiter ve *C. frutescens* 14.6.1.9 kullanarak polimorfizm için testlenmiştir. Bu işaretleyicilerden sadece 30 adeti (%21) ebeveynler arasında polimorfizm vermiş ve popülasyonunda haritalanmıştır (Şekil 9). Domates SSR'lerinin hiç birisi biber anaçları arasında polimorfizm vermemiştir. Tablo 15 bu işaretleyicilerin listesini ve her bir anaç için amplifikasyon ürünlerinin beklenen büyüklüklerini vermektedir. Biber F<sub>2</sub> popülasyonunda haritalanan 30 Hpms işaretleyicisinde 13 tanesi (%43) kodominant bir işaretleyiciden beklenen 1:2:1 açılım oranına uymamıştır (Tablo 17). Yaklaşık olarak eşit miktarda işaretleyici *C. annuum* homozigot (altı işaretleyici) ve heterozigot (beş işaretleyici) genotiplere doğru meyil göstermiştir. Sadece iki işaretleyicide *C. frutescens* homozigot genotipine doğru meyil belirlenmiştir.

Tablo 15. *C. annuum* cv. Jupiter and *C. frutescens* 14.6.1.9 anaçları arasında polimorfik bulunan Hpms işaretleyicilerinin listesi. PCR sonrası elde edilen çoğaltılmış parçacıkların büyüklükleri ayrıca verilmiştir.

<b>Primer ismi</b>	<b>C.frutescens için büyüklük</b>	<b>C.annuum için büyüklük</b>
Hpms1-5	280	420+300
Hpms1-281	150	120
Hpms1-3	200	210
Hpms1-41	210	200
Hpms1-155	160	180
Hpms1-43	190	220+200
Hpms2-24	200	210
HpmsAT2-20	200	180
Hpms2-21	250	300
Hpms2-23	300	350
HpmsE002	300	350
HpmsE005	450	400
HpmsE003	350	330
HpmsE049	500	450
HpmsE116	400	390
HpmsE129	480	500
HpmsE013	510	500
HpmsE130	500+490	470
HpmsE006	480	500
HpmsE149	180	200
HpmsE014	100	110
HpmsE017	190	200
HpmsE033	250	240
HpmsE016	180	170
HpmsE082	240	230
HpmsE126	210	190
HpmsE074	240	230
Hpms1-214	200	190
HpmsE144	320	350
HpmsE137	200	190

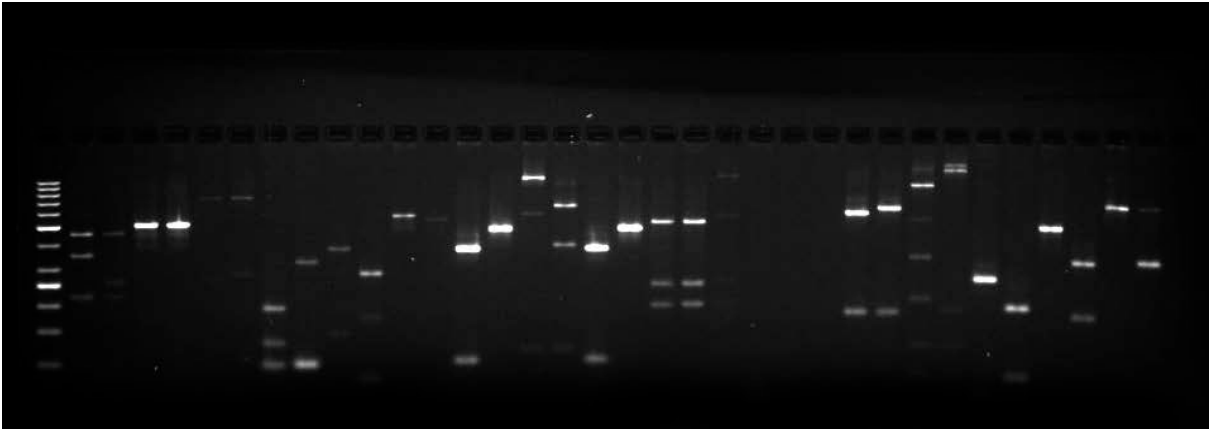


Şekil 9. Biber F<sub>2</sub> populasyonuna test edilen bir Hpms işaretleyicisi örneği. 1. Hat DNA büyüklük standartı, 2. Hat *C. annuum*, 3. Hat *C. frutescens* ve F<sub>2</sub> populasyonu (4. Hattan sona kadar) agarose jelde yürütülen Hpms SSR'nın görüntüsü. İlk ve son hatlarda 100 bp'lik

standart DNA uzunluk yüklenmiştir. Örnekler: 1 = homozigot *C. annuum* allelleri için; 3 = homozigot *C. frutescens* allelleri için; 2 = heterozigot bireylerin allelleri için şeklinde genotipik olarak skorlanmıştır.

#### 4.3.3. COSII işaretleyicileri

CosII işaretleyicileri domates ve yakın akraba türler arasında paylaşılan konsensüs diziler kullanılarak dizayn edilmiş CAP türü işaretleyicilerdir ([http://www.sgn.cornell.edu/markers/cosii\\_markers.pl](http://www.sgn.cornell.edu/markers/cosii_markers.pl)). Toplam 287 adet CosII işaretleyicisi biber haritalama popülasyonunun anaçları olan *C. annuum* cv. Jupiter ve *C. frutescens* 14.6.1.9 kullanarak polimorfizm için testlenmiştir. Şekil 10 bazı CosII işaretleyicilerinin ebevenyeleri kullanılarak yapılan polimorfizm testlemeleri sonuçlarını göstermektedir. Biber anaçlarında polimorfik bulunan 60 (%21) CosII işaretleyicisi popülasyonda haritalanmıştır. Şekil 11 test edilen CosII işaretleyicilerinden bir tanesinin haritalama sonuçlarını göstermektedir. Tablo 13 CosII işaretleyicilerinin listesini ve polimorfik bulunan enzimleri ve kesimleme sonrası elde edilen ürünün büyüklüğünü vermektedir. Haritalanan 60 CosII işaretleyicisinden 21 (%35) adeti kodominant bir için beklenen 1:2:1 açılım oranına uymamıştır (Tablo 17). 17 adet CosII işaretleyicisi *C. annuum* homozigot genotiplerine, üç tanesi heterozigot genotiplere ve sadece bir işaretleyicide ise *C. frutescens* homozigot genotiplerine doğru meyil belirlenmiştir.



Şekil 10. Polimorfizm için CosII işaretleyicileri ile yapılan survey çalışması. Her çift hatta *C. annuum* ve *C. frutescens* yer almaktadır. Testlenen işaretleyiciler polimorfik enzimleri ile birlikte gösterilmiştir. İlk hatta 100 bp'lik DNA büyüklük standartı yüklenmiştir. \*ile gösterilen işaretleyiciler polimorfik bulunmuştur.



Table 16. COSII işaretleyicileri listesi ve polimorfik bulunan enzimlerle kesildikten sonra elde edilen restriksiyon ürününün büyüklükleri.

<b>Primer ismi</b>	<b>Polimorfik enzim</b>	<b><i>C.frutescens</i> için ürün uzunluğu</b>	<b><i>C.annuum</i> için ürün uzunluğu</b>
1g07080	EcoRV	650	310
4g33250b	Hinf I	50	80
3g63190b	EcoRV	380+120	210+150+120
1g27385	Hinf I	250	190
5g13450	Cfo I	750	640
1g71810	Afl II	1100	620+500
1g55880	Dra I	580	400+200
2g37240	Taq I	500	300+200
5g60990	Taq I	650	700
3g23400	PCR	820	850
2g28490	Rsa I	900	840
1g46480	EcoRI	1000	1100
2g45910	Apo I	900	1100
3g13700	PCR	920	800
4g16580	Hind III	550+200	350+200
1g17410	Rsa I	480+250+210	480+350+210
1g30360	PCR	850+700	850+750
4g18593	Alu I	750	500
1g18270	Dra I	380	490
2g28250	Hinf I	500	300+180
3g06580	Rsa I	200	300
1g67730	PCR	700	920
5g59960	Rsa I	550+250	450+250
3g56040	Acc I	520+210	800
4g37130	Rsa I	220	210
5g49970	EcoRV	750	500
5g38530	Rsa I	400	390
3g17040	Ase I	400	380
1g14790	Cfo I	1100	680+390
2g38020	Alu I	390+300+250	700+250
3g27200	Dpn II	280+220	350+220
1g78230	Rsa I	290+170	170+150
5g19690	PCR	850	920
5g27390	EcoRV	480	470
1g51160	Dra I	1000	600+380
1g78690	Hinc II	1050	550+500
5g52820	Ase I	800	400
3g62940	Cfo I	750+320	1100
4g26680	Nsi I	400	300
1g20575	Taq I	400	500
1g18660	Taq I	180	280
1g18640	Cfo I	280+140	280+120
1g65720	Cfo I	390	400

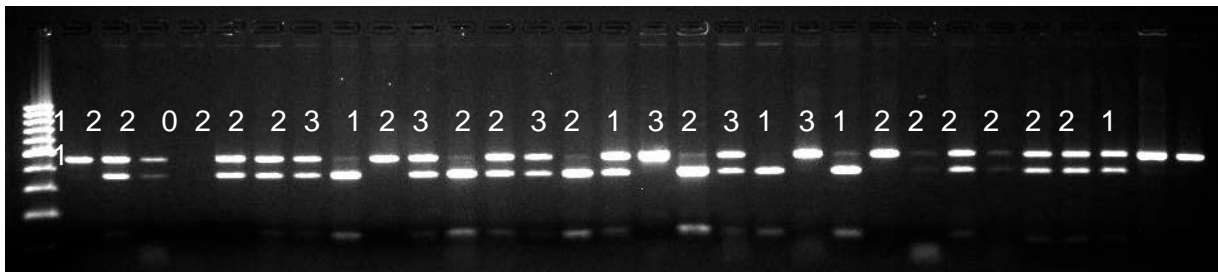
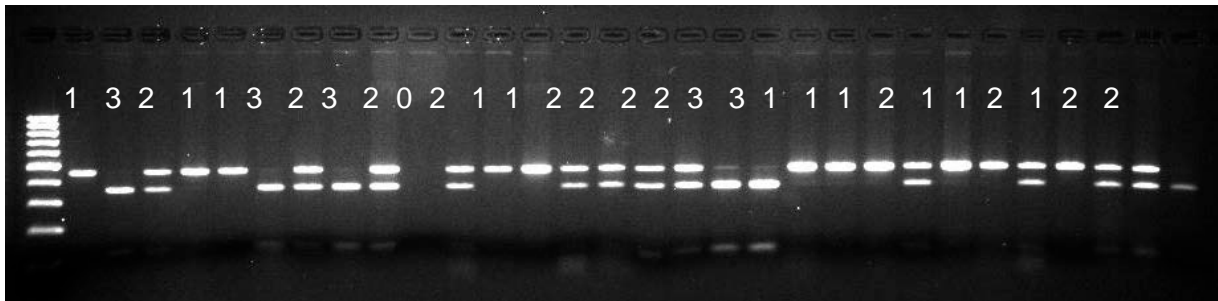
2g39690	Ssp I	580	480
2g46580	Taq I	400+310	400+350
5g60540	PCR	850	1000
4g16710	Taq I	550+350	350
4g30580	Rsa I	210+190	400
1g24360	Hae III	1050	650+400
4g35560	ScrF I	280+80	280+110
3g63190	EcoRV	350+120	210+150+120
5g01990	Sty I	250	120
5g07960	Rsa I	350+200+180	400+200+180
3g13180	Rsa I	350	320
5g57970	Dra I	830	700
3g09920	Hae III	180+110	140+110
3g02220	Rsa I	800+280	800+290
2g18050	Xba I	220	250
3g58790	Hae III	510	500
4g01880	ScrF I	400	380

Tablo 17. F<sub>2</sub> populasyonu için ki kare uygunluk (iyi uyum) testinden elde edilen ki kare ve P-değerleri. \*istatistiki olarak önemli değerleri göstermektedir (P<0.05).

İşaretleyici	Ki kare	P	AA	Aa	aa	Sayı
Hpms1-3	9,02	0,011*	29	32	12	73
Hpms1-5	2,31	0,3151	18	44	14	76
Hpms1-41	4,52	0,1044	27	32	17	76
Hpms1-43	9,32	0,0095*	30	32	13	75
Hpms1-155	39,65	<0.0001*	2	65	9	76
Hpms1-214	0,29	0,865	15	32	18	65
Hpms1-281	2,21	0,3312	24	34	16	74
Hpms2-21	0,25	0,8825	20	38	17	75
Hpms2-23	4,74	0,0295*	26	40	5	72
Hpms2-24	0,71	0,7012	19	41	16	76
HpmsAT2-20	8,5	0,0143*	18	49	9	76
HpmsE002	1,12	0,2899	15	42	18	76
HpmsE003	1,18	0,5543	22	33	20	75
HpmsE005	13,97	0,0009*	16	53	7	76
HpmsE006	2,84	0,2417	15	36	25	76
HpmsE013	0,63	0,4274	22	24	29	76
HpmsE014	4,31	0,0379*	17	38	9	65
HpmsE016	6,84	0,0089*	23	24	5	53
HpmsE017	7,29	0,0069*	19	39	7	66
HpmsE033	0,1	0,7518	12	26	12	52
HpmsE049	17,97	0,0001*	14	27	35	76
HpmsE074	7,06	0,0293*	25	31	10	66
HpmsE082	5,34	0,0693	23	31	10	64
HpmsE116	2,21	0,3312	12	37	20	69

HpmsE126	12,44	0,002*	27	31	7	65
HpmsE129	7,65	0,0218*	10	39	27	76
HpmsE130	0,01	0,995	18	35	18	71
HpmsE137	3,09	0,2133	19	35	10	64
HpmsE144	0,12	0,729	17	31	15	65
HpmsE149	1,59	0,4516	21	32	14	67
1g07080	3,12	0,2101	21	32	11	64
1g14790	3,55	0,1695	16	27	7	50
1g17410	9,92	0,007*	5	16	18	49
1g18270	1,48	0,4771	20	33	13	66
1g18640	3	0,2231	18	27	9	54
1g18660	2,79	0,2478	20	36	11	67
1g20575	11,32	0,0008*	28	22	12	65
1g24360	0,49	0,7827	12	26	10	48
1g27385	7,33	0,0256*	25	38	9	72
1g30360	1,09	0,5798	16	34	12	62
1g46480	10,13	0,0063*	25	22	11	58
1g51160	1,74	0,1871	20	35	6	62
1g55880	3,41	0,1818	24	35	13	72
1g65720	1	0,6065	15	25	10	50
1g67730	2,71	0,2579	18	22	16	56
1g71810	0,41	0,522	25	25	14	65
1g78230	7,52	0,0233*	25	23	17	65
1g78690	6,91	0,0316*	19	16	14	49
2g18050	1,57	0,2102	20	29	11	61
2g28250	0,69	0,4062	12	14	11	39
2g28490	5,21	0,0739	10	32	23	65
2g37240	1,35	0,2453	22	36	11	71
2g38020	3	0,0833	20	33	10	64
2g39690	3,31	0,1911	20	33	10	63
2g45910	6,44	0,04*	26	29	13	68
2g46580	19,8	0,0001*	24	16	5	45
3g02220	1,43	0,4892	16	25	10	51
3g06580	6,94	0,0311*	25	24	19	68
3g09920	0,72	0,6977	15	32	12	59
3g13180	6,74	0,0344*	17	39	7	63
3g13700	14,14	0,0009*	27	30	6	63
3g17040	0,17	0,9185	12	27	12	51
3g23400	8,5	0,0143*	25	36	8	69
3g27200	4,75	0,0293*	22	24	11	59
3g56040	0,02	0,8875	16	41	3	62
3g58790	3,67	0,1596	17	36	9	62
3g62940	9,95	0,0069*	10	44	9	63
3g63190	10,71	0,0011*	27	24	11	63
3g63190b	9	0,0111*	27	27	12	66
4g01880	2,96	0,2276	20	24	14	58
4g16580	16,52	0,0003*	25	20	6	51

4g16710	1,93	0,1648	15	0	0	44
4g18593	1,28	0,5273	18	33	12	63
4g26680	4,79	0,0912	19	39	9	67
4g30580	0,65	0,7225	17	33	13	63
4g33250b	48	<0.0001*	42	12	18	74
4g35560	4,75	0,093	23	30	11	64
4g37130	2,91	0,2334	20	37	11	68
5g01990	0,53	0,4666	8	35	18	62
5g07960	3,88	0,0489*	16	33	8	58
5g13450	8,93	0,0028*	28	27	13	69
5g19690	0,04	0,9802	13	25	12	50
5g27390	4,39	0,1114	20	27	9	56
5g38530	4,39	0,1114	22	26	12	60
5g49970	3,6	0,1653	15	36	9	60
5g52820	0,12	0,729	18	39	9	67
5g57970	4,36	0,113	22	25	13	60
5g59960	2,35	0,3088	17	37	11	65
5g60540	3,92	0,1409	15	17	7	41
5g60990	18,31	0,0001*	33	25	12	70



Şekil 11. Biber F<sub>2</sub> populasyonunda test edilen bir CosII örneği. *C. annuum* (2. hat), *C. frutescens* (3. hat) ve F<sub>2</sub> populasyonuna (4. hat ve sonrası) ait DNA'lar At\_1g18270 CosII işaretleyicisi ile çoğaltılmış ve *DraI* restriksiyon enzimi ile kesimlenmiştir. 1. hatta 100 bp'lik standart DNA uzunluk merdivini yüklenmiştir. Örnekler: 1 = homozigot *C. annuum* allelleri için; 3 = homozigot *C. frutescens* allelleri için; 2 = heterozigot bireylerin allelleri için şeklinde genotipik olarak skorlanmıştır.

#### 4.4. QTL Analizleri

QTL analizleri F<sub>2</sub> populasyonundan gelen genotipik veriler ile F<sub>3</sub> ailelerinden gelen fenotipik veriler kullanılarak uygulanmıştır. Bu analizler için toplam 570 adet moleküler işaretleyici (30 SSR, 60 CosII ve 480 AFLP) kullanılmıştır. Toplam olarak, CMV ile bağlantılı olan yedi genomik bölge belirlenmiştir (Tablo 18).

Table 18. Biber F<sub>2</sub> populasyonunda belirlenen QTL'ler. En önemli işaretleyiciler işaretleyici sütununda verilmiştir. R alleli dayanıklılığın hangi ebeveyninden geldiğini göstermektedir (Cf = *C. frutescens*; Ca = *C. annuum*). R<sup>2</sup> değeri her bir QTL'in toplam fenotip varyasyon (dayanıklılık) içerisindeki oranıdır. Karakter sütununda üzerinde QTL belirlenen karakterler listelenmiştir.

QTL lokusları	İşaretleyici	P-değeri	R <sup>2</sup>	Karakterler	R Alleli
<i>cmv1</i>	AB120	0,0008	18%	<b>4WE</b> , 8WE, AVE	Cf
<i>cmv2</i>	CD110	0,0015	16%	4WE, <b>8WE</b> , <b>AVE</b>	Ca
<i>cmv3</i>	GH73	0,0025	16%	<b>4WE</b> , 8WE, AVE	Cf
<i>cmv4</i>	FG63	0,004	14%	<b>4WE</b> , 8WE, AVE	Ca
<i>cmv5</i>	Hpms1-214	0,0055	16%	<b>4WE</b> , AVE	Cf
<i>cmv6</i>	AB70	0,0059	12%	4WE, <b>8WE</b> , AVE	Ca
<i>cmv7</i>	CD120	0,0082	11%	<b>4WE</b> , 8WE, AVE	Cf

Genel olarak incelendiğinde, bu çalışmadan elde edilen sonuçlar konu ile ilgili biber'de daha önce yapılan çalışmalarla benzer sonuçlar ortaya koymuştur. Bu sonuçlardan bir tanesi CMV dayanıklılığının kantitatif bir karakter olmasıdır. Önceki yayınlanmış çalışmalarda, CARANTA ve ark. (1997a) CMV dayanıklılığı için toplam fenotipik varyasyonun, sırasıyla, %24 ve %19'lük kısımlarını açıklayan iki QTL bölgesi bulmuşlardır. BEN CHAIM ve ark. (2001b) CMV dayanıklılığı için toplam fenotipik varyasyonun, sırasıyla, %16 ve %33 arasında kısımlarını açıklayan dört QTL bölgesi belirlemişlerdir. CARANTA ve ark. (2002) toplam fenotipik varyasyonun %45 ve %63 lük kısımlarını açıklayan dört QTL bölgesi saptamışlardır. Tablo 15'ten de görüldüğü ve beklenildiği gibi dayanıklılık allelerinin

çoğunluğu CMV dayanıklı *C. frutescens* anacından gelmektedir. Bu çalışmada CMV dayanıklılığı bağlantı gösteren moleküler işaretleyicilerin belirlenmesi bu karakterin moleküler ıslahına imkan sağlayacaktır.

## 5. Sonuç

CMV, TMV ve PVY biber bitkisini infekte eden verim ve kaliteyi olumsuz etkileyerek önemli ekonomik zararlar veren virüslerdir. Bu çalışmanın esas amacı bu üç viral hastalık etmenine karşı dayanıklı çeşit geliştirmede kullanılacak ileri ıslah hatlarının moleküler teknolojiler kullanılarak oluşturulmasıdır. Bu amaç için değişik araştırmacılarından sağlanan genetik materyaller projede dayanıklılık kaynağı olarak kullanılmıştır. Bu materyaller arasında yabancı bir biber türü olan *Capsicum frutescens* esas gen kaynağı olarak kullanılmıştır. Bu projede gen kaynağı olarak kullanılan *Capsicum frutescens* BG2814 nolu tohum örneği Güney Meksika'dan toplanmıştır ve CMV dayanıklı hat olarak geliştirilmiştir. BG2814 nolu tohum örneği Cornell biber ıslahçılarından Prof. Richard Robinson tarafından temin edilmiş ve bir CMV duyarlı *Capsicum annuum* çeşiti ile melezlenerek populasyonlar oluşturulmuştur. Elde edilen  $F_1$  'ler New York'ta problem olan CMV ve TMV ile testlenmiş ve dayanıklı bulunan bitkiler ayrı ayrı kendilenerek ve her generasyonda tarla koşullarında bu iki virüs için seleksiyonlar yapılarak  $F_8$  kademesine kadar getirilmiştir. Bu kademedeki TMV ve CMV için homozigot dayanıklı  $F_8$ -RIL hatları geliştirilmiştir.

CMV/TMV dayanıklı  $F_8$ -RIL hatları bu projede bu iki virüse karşı dayanıklılık ıslahında gen kaynağı olarak kullanılmıştır. Bu projenin esas stratejisi bu üç viral etmene dayanıklılık sağlayan faktörleri bir araya getirmektir. Bu amaç için iki stratejik yol izlenmiştir. Birinci yolda, dayanıklılık faktörlerinin Türk çeşitlerine aktarılması konusu çalışılmıştır. Bu amaç için, elde edilen  $F_8$ -RIL hatları projede öngörüldüğü gibi üç viral etmene karşı testlenmiş ve bu hatlarda bu virüslere karşı dayanıklılık belirlenmiştir (Tablo 3, 5, 11). Bu hatların sadece CMV değil ama aynı zamanda TMV, TSWV, PVY gibi virüslere de dayanıklı olduğu rapor edilmiştir (Molly Jahn, kişisel görüşme). Dolayısıyla, bu üç viral etmene dayanıklılık faktörlerinin Türk çeşitlerine aktarılması için  $F_8$  hatlarından bazıları Bağcı Çarliston, Sera Demre ve Dolmalık Biber tipleriyle melezlenmiştir (Tablo 4, 6). Dayanıklı bulunan  $F_1$  'ler kendilenerek  $F_2$  populasyonları ve uygun ebevenlerine geriye melezlenerek  $BC_1$  generasyonları oluşturulmuştur.

Paralel olarak izlenen ikinci stratejik yolda, dayanıklılıkta rol oynayan genlerle bağlantı halinde olan moleküler işaretleyicilerin geliştirilmesine çalışılmıştır. Böylece, bu üç genin moleküler ıslahının imkan dahilinde olması planlanmıştır. Bu projede öngörülen virüslere dayanıklılık genleri için populasyonlar geliştirilirken konu ile ilgili diğer çalışmalar incelenmiştir. INRA-Fransa araştırmacılarından CAROL CARANTA ve ark. (1999) *Pvr4* genini biber genomunda haritalamış ve gen ile bağlantı halinde olan bir işaretleyiciyi yayınlamıştır. *Pvr4* geni Mesika orijinli bir *Capsicum annuum* Criollo de Moreles 334 (CM334) tohum örneğinden belirlenmiştir. Bu araştırmacılara göre, *Pvr4* geni bilinen bir çok PVY patovarylarına karşı dayanıklılık sağlamaktadır. Bu projede kullanılan F<sub>8</sub> hatlarının ve haritalama populasyonunun donör anacı olan ve Meksika orijinli olan *Capsicum frutescens* BG2814.6.1.9 nolu hat ve F<sub>2</sub> populasyonu ile *Pvr4* genini tanımlayan moleküler işaretleyici kullanılarak yapılan PCR çalışmalarında BG2814.6.1.9 nolu hatta homozigot düzeyde olduğu ve F<sub>2</sub> populasyonunda da açılım gösterdiği belirlenmiştir (veri gösterilmemiştir). Muhtemelen *Capsicum frutescens* BG2814.6.1.9 nolu hattın gelen PVY dayanıklılığında *Pvr4* genidir. Ancak, bu durumun kesin olarak ortaya konması için CM334 ve BG2814.6.1.9 nolu hatlar arasında komplementasyon analizleri yapılması gereklidir. Bunun için bu iki hat melezlenir ve elde edilen F<sub>2</sub> ler PVY ile inoküle edilir ve açılım oranlarına bakılır. *Pvr4* geni dominant bir gen olduğu için bu iki hattın melezlenmesi ile oluşturulan F<sub>2</sub> populasyonunda 3:1 Mendel oranlarında açılım göstermesi gereklidir. Bu oranın dışındaki açılımlar ise başka genin varlığına işaret eder. Dolayısıyla, bu projede kullanılan materyalde *Pvr4* geni açılım gösterdiği için ayrıca bir haritalama yapmaya gerek duyulmamıştır. *C. frutescens* BG2814 nolu hattın geliştirilen populasyonların *Pvr4* işaretleyicisi kullanılarak PVY dayanıklılığında rol oynayan *Pvr4* geni Türk çeşitlerine aktarılabilir.

TMV'ye dayanıklı ıslah hatlarının oluşturulması ve Türk çeşitlerine aktarılması projenin diğer bir ayağını oluşturmaktadır. TMV Tobamovirüs grubu içerisinde yer alır ve Tobamovirüslerde P0, P1, P1-2, ve P1-2-3 olmak üzere dört patotip bildirilmiştir. Bu sınıflandırma dayanıklılık geninin (*L*) farklı allellerini (*L*, *L*<sup>1</sup>, *L*<sup>2</sup>, *L*<sup>3</sup>, *L*<sup>4</sup>) taşıyan genotipler kullanılarak yapılmıştır. Ülkemizde P1-2 patovaryı yaygın olmasına rağmen P1-2-3 patovaryısında son yıllarda görüldüğü ve hızla yaygınlaştığı bildirilmektedir. Bu projede esas itibarıyla *C. frutescens* BG2814 nolu hat ve bu hattın türetilmiş F8-RIL hatlarının üç viral etmene karşı genetik potansiyellerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Yapılan önceki ve bu çalışmada BG2814 ve F8 hatlarında üç viral etmene karşı dayanıklılık belirlenmiştir. *Capsicum* türlerinin

Tobamovirüslere dayanıklılığı  $L$  geninin patovar spesifik allelleri ile sağlanmaktadır.  $L$  lokusu 11. kromozomun güney tarafındaki telomerik bölgede haritalanmıştır (LEFEBVRE ve ark., 2002). Bu çalışmada gen kaynağı olarak kullanılan *C. frutescens*  $L^2$  alellini taşımaktadır ve altı Tobamovirüse karşı dayanıklılık sağlamaktadır (Tablo 19). Ancak, bu allel ülkemizde yaygın olarak bulunan P1-2 ve P1-2-3 patovalarına karşı dayanıklılık sağlamamaktadır. Dolayısıyla, bu dayanıklılığın ülkemizde kullanımı oldukça sınırlıdır. Buna rağmen, bu dayanıklılık kaynağı Türk çeşitlerine aktarılmaya proje kapsamında devam edilmektedir. Projenin bu alt kısmında da dayanıklılıkta rol oynayan genin biber genomdaki yeri bilindiği için haritalama çalışması yapılmasına gerek kalmamıştır.

Tablo 19. Biberde  $L$  allellerinin tobamovirüslere karşı sağladığı dayanıklılıklar.  $L^3$  ve  $L^4$  allelleri yedi değişik tobamovirüse karşı geniş bir koruma sağlamaktadır.

Tobamovirus	Patojen	$L^+$	$L1;1C$	$L^2$	$L^3$	$L^4$
Tobacco mosaic virus (TMV)	Po	F	R	R	R	R
Tomatomosaic virus (ToMV)	Po	F	R	R	R	R
Bell pepper mottle virus (BePMoV)	Po	F	R	R	R	R
Tobacco mild green mosaic virus (TMGMV)	Po/P1	F	R/F	R	R	R
Paprika mild mosaic virus (PaMMV)	P1	F	F	R	R	R
Dulcamara yellow fleck virus (DYFV)	P1	F	F	R	R	R
Pepper mild mottle virus (PMMoV)	P1.2	F	F	F	R	R
	P1.2.3	F	F	F	F	R

$L^3$  ve  $L^4$  genleri biberde bütün tobamovirüslere karşı dayanıklılık sağladığı için biber ıslahında kullanılması gereklidir.  $L^3$  alellini taşıyan biber genotipleri P0, P1, P1-2 patovalarına,  $L^4$  alellini taşıyanlar ise P1-2-3 patovalarını kapsayan bilinen bütün patovarlara karşı koruma sağlamaktadır.  $L^3$  geni *C. chinense* PI152225 nolu tohum örneğinden  $L^4$  geni ise *C. chacoense* PI260429 nolu tohum örneğinden gelmektedir. Ayrıca,  $L^3$  (SUGITA ve ark., 2004) ve  $L^4$  (MATSUNAGA ve ark., 2003) genlerini tanımlayan moleküler işaretleyicilerin belirlenmiş olması bu genlerin moleküler ıslahta kullanılmasına imkan sağlamıştır.



Projenin üçüncü ayağında Türkiye’de biber tarımına önemli zararlar yapabilen CMV hedeflenmiştir. TMV ve PVY çalışmalarından farklı olarak projenin bu alt kısmında dayanıklılık faktörlerinin belirlenmesi için haritalama çalışması yapılmıştır. *C. frutescens* BG2814.6.1.9 nolu hat ve bu hattan türetilmiş F8-RIL hatlarında CMV dayanıklılığı belirlenmiş (GRUBE ve ark. 2000) olmasına rağmen herhangi bir haritalama çalışması yapılmamıştır. Dolayısıyla, bu çalışmanın amacı elde edilen ve geliştirilen hatları ve populasyonları CMV dayanıklılığı için karakterize etmektir. Bu amacı gerçekleştirmek için, biber populasyonları fenotipik ve genotipik olarak karakterize edilmiştir. Çalışmada kullanılan biber bitkileri CMV-Fny patovarı ile mekanik olarak inoküle edilmiş ve görsel ve serolojik olarak ELISA ile değerlendirilmiştir. Bu sonuçlara göre, populasyondaki CMV dayanıklılığı gerçek dayanıklılık olarak belirlenmiştir. Toplam 480 AFLP, 30 SSR ve 60 COSII işaretleyicisi polimorfik bulunmuş ve biber F<sub>2</sub> haritalama populasyonunda genotiplenmiştir. Genotipik karakterizasyon biber’de CMV dayanıklılığının multigenik bir olduğunu ve çok sayıda kantitatif karakter lokusu (QTL) tarafından kontrol edildiğini ortaya koymuştur. Genotipik karakterizasyonun bir sonucu olarak, yedi QTL bölgesinin biber’de CMV dayanıklılığı ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Dayanıklılık lokusların yarısından çoğu (%57) *C. frutescens* allellerinden gelmektedir. Bu işaretleyiciler kullanılmak suretiyle biber’de CMV dayanıklılığını Türk biber çeşitlerine aktarmak mümkün olacaktır. Bu çalışmaya gelecek adım olarak, bu QTL’ler için bir genetik bağlantı haritası oluşturulmalıdır ve dayanıklılığın moleküler mekanizmaları belirlenmelidir.

## EK-2

### Referanslar

1. AGRIOS G. N., Plant Diseases Caused by Viruses, Plant Pathology, Third Edition, *Academic Press, INC.*, California, 803s, (1997).
2. BARNETT A., WOOD K. R., *Plant Pathology*, 12:257-277, (1978).
3. BAULCOMBE D., RNA silencing in plants, *Nature*, 431:356–63, (2004).
4. BEACHY R. N., LOESCH-OESCH-FRIES S., TUMER N. E., *Annu. Rev. Phytopathol.*, 28:451-474, (1990).
5. BECKER J., VOS P., KUIPER M., SALAMINI F., HEUN M., Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley, *Mol. Gen Genet*, 249:65-73 (1995).
6. BECZNER L., HORVATH J., ROMHANY I., FORSTER H., Studies on the Etiology of Tuber Necrotic Ringspot Disease in Potato, *Potato Research*, 27: 339–352, (1984).
7. BEN CHAIM A., GRUBE R., LAPIDOT M., JAHN M., PARAN I., Identification of quantitative trait loci associated with resistance to cucumber mosaic virus in *Capsicum annuum*. *Theor. Appl. Genet.*, 102:1213-1220, (2001b).
8. BREYNE P., Genetic diversity analysis within tropical plant species using AFLP-based markers. 2nd IUPAC International Conference on Biodiversity, Belo Horizonte (Brasil), July 11-15, (1999).
9. BOONHAM N., BARKER I., Strain Specific Recombinant Antibodies to *Potato Virus Y* potyvirus, *Journal of Virological Methods*, 74: 193–199, (1998).
10. BOWERS J. E., DANGL G. S., VIGNANI R., MEREDITY C. P., Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.), *Genome*, 39:628-633, (1996).
11. BRUNT A., CRABTREE K., GIBBS A., Viruses of tropical plants: descriptions and lists from the VIDE database. *CAB international*, Wallingford, UK, (1990).
12. CARANTA C., PALLOIX A., LEFEBRE V., DAUBEZE A. M., QTLs for a component of partial resistance to cucumber mosaic virus in pepper: restriction of virus installation in host-cells, *Theor. Appl. Genet.*, 94:431-438, (1997a).
13. 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.*, 10:872-878, (1997).
14. CARANTA C., PFLIEGER S., LEFEBVRE V., DAUBEZE A. M., THABUIS A., PALLOIX A., QTLs involved in the restriction of cucumber mosaic virus (CMV) long-distance movement in pepper, *Theor. Appl. Genet.*, 104:586-591, (2002).
15. CELEBI-TOPRAK F., SLACK S. A., RUSSO P. Potato resistance to cucumber mosaic virus is temperature sensitive and virus-strain specificity, *Breeding Science*, 53: 69-75, (2003).
16. CHEN B., FRANCKI R. I. B., Cucumovirus transmission by the aphid *Myzus persicae* is determined solely by the viral coat protein, *Journal of General Virology*, 71:939-944, (1990).

17. CLARK M.F., ADAMS A. N., Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses, *Journal of General Virology*, 34:475-483, (1977).
18. CRESCENZI A., BARBAROSSA L., GALLITELLI D., MARTELLI G. P., Cucumber mosaic cucumovirus populations in Italy under natural epidemic conditions and after a satellite-mediated protection test, *Plant Dis.*, 77:28-33, (1993).
19. DANIELS J., CAMPBELL R. N., Characterization of cucumber mosaic virus isolates found in California, *Plant Dis.*, 76:1245-1250, (1992).
20. DAVIS C., SYMONS R. H., Further implications for the evolutionary relationship between tripartite plant viruses based on cucumber mosaic virus RNA3, *Virology*, 165:216-224, (1988).
21. DING S. W., LI W. X., SYMONS R. H., A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement, *EMBO J.*, 14:5762-5772, (1995).
22. DOUINE L., QUIOT J. B., MARCHOUX G., ARCHANGE P., Index of plants susceptible to cucumber mosaic virus bibliographical study, *Ann. Phytopathol.*, 11:439-475, (1979).
23. EDWARDS M. D., PAGE N. J., Evaluation of marker-assisted selection through computer simulation, *Theor. Appl. Genet.*, 88:376-382, (1994).
24. EDWARDS M. D., STUBER C. W., WENDEL J. F., Molecular facilitated investigations of Quantitative trait loci in maize. I. Number, genomic distribution and types of gene action, *Genetics*, 116:113-125, (1987).
25. FAO., Food and Agricultural Organization of the United Nations, <http://www.faostat.org>, (2005).
26. FARILE A., ALONSO-PRADOS J. L., ARANDA M. A., BERNAL J. J., MALPICA J., GARCIA-ARENAL F., Genetic exchange by recombination or reassortment is infrequent in natural populations of a tripartite RNA plant virus, *J. Virol.*, 71:934-940, (1997).
27. FRANCKI R. I. B., MOSSOP D. N., HATTA T., Cucumber mosaic virus, *CMI / AAB, Description of Plant Viruses*. No: 213, 6 pp., (1979).
28. FRARY A., XU Y., LIU J., MITCHELL S., TEDESCHI E., TANKSLEY S., Development of a set of PCR-based anchor markers encompassing the tomato genome and evaluation of their usefulness for genetics and breeding experiments, *Theor. Applied Genet.*, 111:291-312, (2005).
29. FULTON T. M., CHUNWONGSE J., TANKSLEY S. D., Microprep protocol for extraction of DNA from Tomato and other herbaceous plants, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 13:207-209, (1995).
30. GALLITELLI D., The ecology of Cucumber mosaic virus and sustainable agriculture, *Virus Research*, 71:9-21, (2000).
31. GARCIA-ARENAL F., ESCRIBU F., ARANDA M. A., ALONSO-PRADOS J. L., MALPICA J., FARILE A., Molecular epidemiology of Cucumber mosaic virus and its satellite RNA, *Virus Research*, 71:1-8, (2000).
32. GOLDBACH R., BUCHER E., PRINS M., Resistance mechanisms to plant viruses: an overview, *Virus Research*, 92:207-212, (2003).
33. GONDA T. J., SYMONS R. H., Cucumber Mosaic Virus Replication in Cowpea Protoplasts: Time Course of Virus, Coat Protein and RNA Synthesis, *J. Gen. Virol.*, 45:723-736, (1979).

34. GRUBE R. C., RADWANSKI E. R., JAHN M., Comparative genetics of disease resistance within the solanaceae, *Genetics*, 155:873-887, (2000A).
35. GRUBE R. C., ZHANG Y., MURPHY J. F., LOAIZA-FIGUEROA L., LACKNEY V. K., PROVVIDENTI R., JAHN M. M., New source of resistance to Cucumber mosaic virus in *Capsicum frutescens*, *Plant Dis.*, 84:885-891, (2000b).
36. GRUBE R. C., BLAETH J. R., ARNEDO ANDRES M. S., CARANTA C., JAHN M. M., Identification and comparative mapping of a dominant potyvirus gene cluster in *Capsicum*, *Theor. Appl. Genet.*, 101:852-859, (2000C).
37. HAMALAINEN J. H., WATANABE K. N., VALKONEN J. P. T., ARIHARA, A., PLAISTED R.L., PEHU, E., MILLER, L., SLACK S. A., Mapping and Marker-Assisted Selection for a Gene for Extreme Resistance to Potato Virus Y, *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 192–197, (1997).
38. HAN T. H., VAN ECK H. J., DE JEU M. J., JACOBSEN E., Optimization of AFLP fingerprinting of organisms with a large-sized genome: A study on *Alstroemeria* spp., *Theor. Appl. Genet.* 98:465-471, (1999).
39. HAYES R. J., BUCK K. W., Complete replication of a eukaryotic virus RNA in vitro by a purified RNA-dependent RNA polymerase, *Cell*, 63:363-368, (1990).
40. JACQUOT E., TRIBODET M., CROIZAT F., BALME-SINIBALDI V., KERLAN C., A Single Polymorphism-based Technique for Specific Characterization of Y<sup>O</sup> and Y<sup>N</sup> Isolates of Potato Virus Y (PVY), *Journal of Virological Methods*, 125: 83–93, (2005).
41. KANG B. C., NAHM S. H., HUH J. H., YOO H. S., YU J. W., LEE M. H., KIM B. D., An inter-specific (*Capsicum annuum* x *C. chinense*) F2 linkage map in pepper using RFLP and AFLP markers, *Theor. Appl. Genet.*, 102:531-539, (2001).
42. KEARNEY C. M., ZITTER T. A., GONSALVES D., A field survey for serogroups and the satellite RNA for cucumber mosaic virus, *Phytopathology*, 80:1238-1243, (1990).
43. KLUG A., The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly, *Philo. Trans. Royal Soc. Biol. Sciences*, 354: 531-535, (1999).
44. LANDE R., THOMPSON R., Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits, *Genetics*, 124:743-756, (1990).
45. LEE J. M., KIM B. D., Combined genome mapping of RFLP-AFLP-SSR in pepper, *Genomics and Informatics*, 12:108-112, (2003).
46. LEE J. M., NAHM S. H., KIM Y. M., KIM B. D., Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper, *Theor. Appl. Genet.*, 108:619-627, (2004).
47. LEFEBVRE V., PALLOIX A., Both epistatic and additive effects of QTLs are involved in polygenic induced resistance to disease: a case study, the interaction pepper-*Phytophthora capsici* Leonian, *Theor. Appl. Genet.*, 93:503-511, (1996).
48. LEFEBVRE V., PFLIEGER S., THABUIS A., CARANTA C., BLATTES A., CHAUVET J. C., DAUBEZE A. M., PALLOIX A., Towards the saturation of the pepper linkage map by alignment of three intraspecific maps including known-function genes, *Genome*, 45:839-854, (2002).

49. LI H. W., LUCY A. P., GUO H. S., LI W. X., JI L. H., WONG S. M., DING S. W., Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism, *EMBO J.*, 18:2683-2691, (1999).
50. LIVINGSTON K. D., LACKNEY V. K., BLAETH J., WIJK V. R., JAHN M. M., Genome mapping in Capsicum and the evolution of genome structure in the solanaceae, *Genetics*, 152:1183-1202, (1999).
51. MATSUNAGA H., SAITO A. T., HIRAI M., NUNOME T., YOSHIDA T., DNA Markers Linked to Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV) Resistant Locus (*LA*) in Capsicum, *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 72 (3): 218-220, (2003).
52. MCGREGOR C. E., LAMBERT C. A., GREYLING M. M., LOUW J. H., WARNICH L., A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP, and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm, *Euphytica*, 113:135-144, (2000).
53. MEHLE N., KOVAC M., PETROVIC N., NOVAK M. P., BAEBLER S., STRES H. K., GRUDEN K., RAVNIKAR M., Spread of Potato Virus Y<sup>NTN</sup> in Potato Cultivars (*Solanum tuberosum* L.) with Different Levels of Sensitivity, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 64: 293–300, (2004).
54. MILBOURNE D., MEYER R. C., COLLINS A. J., RAMSAY L. D., GEBHARDT C., WAUGH R., Isolation, characterization and mapping of simple sequence repeat loci in potato, *Mol. Gen. Genet.*, 259:233-245, (1998).
55. MINAMIYAMA Y., TSURO M., HIRAI M., An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*, *Molecular Breeding*, 18:157-169, (2006).
56. NELSON J. C., QGENE: software for marker-based genomic analysis and breeding, *Molecular Breeding*, 3:239-245, (1997).
57. PALUKAITIS P., ROOSSINCK M. J., DIETZGEN R. G., FRANCKI R. I. B., Cucumber mosaic virus, *Adv. Virus Res.*, 41:281-348, (1992).
58. PICKERSGILL B., Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp., *Euphytica*, 96:129–133, (1997).
59. PILLEN K., PINEDA O., LEWIS C. B., TANKSLEY S. D., Status of genome mapping tools in the taxon Solanaceae. *Gen. Mapping in Plants*, ed: Paterson A. H., Landes R. G., Austin, Texas, (1996). Pp. 281-307.
60. RAFALSKY J. A., TINGEY S. V., Genetic diagnostics in plant breeding, RAPDs, microsatellites and machines, *Trends Genet.*, 9:275–279, (1993).
61. ROOSSINCK M. J., Cucumber mosaic virus, a model for RNA virus evolution, *Mol. Plant Pathol.*, 2:59-63, (2001).
62. ROOSSINCK M. J., Evolutionary history of Cucumber mosaic virus deduced by phylogenetic analyses, *Journal of Virology*, 76:3382-3387, (2002).
63. SCHWINGHAMER M. W., SYMONS R. H., Translation of the four major RNA species of cucumber mosaic virus in plant and animal cell-free systems and in toad oocytes, *Virology*, 79:88-108, (1977).
64. SUGITA T., YAMAUCHI K., SUGIMURA Y., NAGATA R., YUJI K., KINOSHITA T., TODOROKI A., Development of SCAR Markers Linked to L3 gene in Capsicum, *Breeding Science*, 54:111-115, (2004).
65. SIKORA E. J., GUDAUSKAS R. T., MURPHY J. F., PORCH D. W., ANDRIANIFAHANANA M.,

66. ZEHNDER G. F., BAUSKE E. M., KEMBLE J. M., LESTER D. F., A multivirus epidemic of tomatoes in Alabama, *Plant Dis.*, 82:117-120, (1998).
67. SINGH R. P., Incidence of the Tobacco Veinal Necrotic Strain of *Potato Virus Y* (PVY<sup>N</sup>) in Canada in 1990 and 1991 and the Scientific Basis for the Eradiction of the Disease, *Canada Plant Disease Survey*, 72: 113–119, (1992).
68. SMITH K. M., Composite Nature of Certain Potato Viruses of the Mosaic Group, *Nature*, 127: 702, (1931).
69. SPETZ C, TABOADA A. M., DARWICH J., RAMSELL L, SALAZAR L. F., VALKONEN J. P. T., Molecular Resolution of a Complex of Potyviruses Infecting Solanaceous Crops at the Centre of Origin in Peru, *Journal of General Virology*, 84: 2565–2578, (2003).
70. STIMMANN M. W., SWENSON K. G., Aphid transmission of cucumber mosaic virus affected by temperature and age of infection in diseased plants, *Phytopathology*, 57:1074-1076, (1967).
71. TANKSLEY S. D., High rates of cross-pollination in chile pepper, *HortScience*, 19:580-582, (1984).
72. TIEN P., WU G., Satellite RNA for the biocontrol of plant disease, *Adv. Virus Res.*, 39:321–339, (1991).
73. VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., LEE T., HORNES M., FRIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M., ZABEAU M., AFLP, a new technique for DNA fingerprinting, *Nucl Acids Research*, 23:4407–4414, (1995).
74. VARVERI C., Potato Y Potyvirus Detection by Immunological and Molecular Techniques in Plants and Aphids, *Phytoparasitica*, 28: 1–8, (2000).
75. WHITHAM S. A., WANG Y., Roles for Host Factors in Plant Viral Pathogenicity, *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 365–371, (2004).
76. WEILGUNY H., SINGH R. P., Separation of Slovenian Isolates of PVY<sup>NTN</sup> from the North American Isolates of PVY<sup>N</sup> by a 3-primer PCR, *J. of Virological Methods*, 71: 57–68, (1998).
77. YI G., LEE J. M., LEE S., CHOI D., KIM B. D., Exploitation of pepper EST-SSRs and an SSR-based linkage map, *Theor. Appl. Genet.*, 114:113-130, (2006).
78. YILDIZ M., ERKAN S., DELEN N., Important vegetable diseases in greenhouse cultivation. *5th Turkish Greenhouse Cult.Symp.*, October 1990, Izmir, 155-174, (1990).
79. YOUNG N. D., QTLmapping and quantitative disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 34: 479–501, (1996).
80. ZAITLIN M., ISRAEL H. W., Tobacco mosaic virus /type strain). *Descr. Plant Viruses* No. 151. Kew, Surrey, England: Commonw. Mycol. Ins./Asn. Appl. Biol., (1975).

**TÜBİTAK  
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

<b>Proje No:</b> 103O063
<b>Proje Başlığı:</b> Biber ( <i>Capsicum annuum</i> )’da Tütün Mozayik Virüsü (TMV), Patates Y Virüsü (PVY), ve Hıyar Mozayik Virüslerine (CMV) Dayanıklılığı Kontrol Eden Genlerin Belirlenmesi, Genetik Haritalanması ve Moleküler Islahı
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> Doç. Dr. Sami Doğanlar, Doç. Dr. Anne Frary, Yrd. Doç. Dr. Mustafa Gümüş, Evrim Balcı, Mehmet Ali Keçeli
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji & Genetik Bölümü, Urla, İzmir 35430
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:</b>
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b> 01.09.2002 – 01.01.2007
<b>Öz (en çok 70 kelime)</b> <p>Günlük diyetimizde önemli bir sebze olan biber bir çok hastalık etmeninden etkilenmektedir. Bu etmenler arasında yer alan virüsler biber üretimini verim ve kalite açısından önemli ekonomik zararlar verirler. Viral hastalık etmenleri ile mücadele etmenin en etken yolu dayanıklı çeşitlerin kullanılmasıdır. Klasik ıslah yöntemleri ile istenilen düzeyde başarı elde edilememiştir. Son yıllarda moleküler teknolojilerin ıslahta rutin olarak kullanılmasıyla biber bitkisine zarar yapan viral hastalık etmenlerine dayanıklı materyallerin geliştirilmesi mümkün olmuştur. Bu projede yabani bir biber türü olan <i>Capsicum frutescens</i> te belirlenen üç viral etmene karşı dayanıklılıkta rol oynayan genlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma sonucunda, gen kaynağı olarak kullanılan <i>Capsicum frutescens</i> ve F8 RIL hatlarında TMV, PVY ve CMV için dayanıklılık belirlenmiştir. Oluşturulan popülasyonlar TMV için <math>L^2</math>, PVY için <i>Pvr4</i> ve CMV için <i>Capsicum frutescens</i> ten gelen <i>cmv1</i>, <i>cmv3</i>, <i>cmv5</i>, <i>cmv7</i> QTLlerini taşımaktadır. Bu genlerle bağlantılı olan işaretleyiciler kullanılarak TMV, PVY ve CMV dayanıklılığında rol oynayan genler Türk Biber çeşitlerine aktarılmaktadır.</p>
<b>Anahtar Kelimeler:</b> Moleküler Islah, Biber, PVY, CMV, TMV, Dayanıklılık, ELISA, QTL, $L^2$ , <i>Pvr4</i>
<b>Projeden Yapılan Yayınlar:</b> Mapping QTLs for Cucumber Mosaic Resistance in Pepper (yazım aşamasında) Construction of Genetic Linkage Map for Pepper Using AFLP, SSR and COSII markers (proje devam ediyor, bu sene sonunda tamamlanacaktır)