T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİBERDE DOMATES LEKELİ SOLGUNLUK VİRÜSÜNE (TSWV) DAYANIKLILIK LOKUSUNUN SCAR İŞARETLEYİCİSİNE (MARKIRINA) ÇEVRİLMESİ

Selcan SEVİNÇ SOLAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

2016

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİBERDE DOMATES LEKELİ SOLGUNLUK VİRÜSÜNE (TSWV) DAYANIKLILIK LOKUSUNUN SCAR İŞARETLEYİCİSİNE (MARKIRINA) ÇEVRİLMESİ

Selcan SEVİNÇ SOLAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

(Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2015-457 nolu proje ile desteklenmiştir.)

2016

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİBERDE DOMATES LEKELİ SOLGUNLUK VİRÜSÜNE (TSWV) DAYANIKLILIK LOKUSUNUN SCAR İŞARETLEYİCİSİNE (MARKIRINA) ÇEVRİLMESİ

Selcan SEVİNÇ SOLAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 15.07.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Hatice İKTEN
Prof.Dr. Nedim MUTLU
Yrd. Doç.Dr. Hasan PINAR

ÖZET

BİBERDE DOMATES LEKELİ SOLGUNLUK VİRÜSÜNE (TSWV) DAYANIKLILIK LOKUSUNUN SCAR İŞARETLEYİCİSİNE (MARKIRINA) ÇEVRİLMESİ

Selcan SEVİNÇ SOLAK

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Danışman: Yrd. Doç. Dr. Hatice İKTEN
Haziran 2016, 78 sayfa

Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV) Dünya'da ve ülkemizde biber üretimini sınırlandıran önemli bitki virüs hastalıklarından bir tanesidir. Bu çalışmada, TSWV'ye dayanıklı çeşit geliştirmek için yapılan ıslah çalışmalarında kullanılan mevcut moleküler testleme yönteminin dezavantajlarını ortadan kaldırılmak amacı ile yeni markır(lar)ın geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Patojenin baskısı altında kaldığı gözlemlenen F4 kademesindeki biber bitkileri arazi koşullarında izlenerek, bunlardan 96 tanesi yeni markır(lar)ın geliştirilmesi için yapılan çalışmalarda çalışma materyali olarak kullanılmıştır. Moury vd (2000) tarafından geliştirilen SCAR markırı kullanılarak ilgili gen bölgesi çoğaltılmış ve iki ayrı CAPS aşamasından sonra genotiplerin kodominant seviyede (RR, Rr, rr) TSWV'ye dayanımları belirlenmiştir. Yeni markır(lar) geliştirilmesi için yapılan çalışmaların birinci kısımında SCAC568 primerinin SRAP primerleri ile kombinasyonları oluşturularak toplamda 58 primer kombinasyonu denenmiştir. Çalışmanın ikinci kısımında ise biber için geliştirilmiş ve çoğu haritalanmış 29 adet SSR primeri kullanılmıştır. Bulk Segregasyon Analizi yöntemi ile polimorfik olduğu belirlenen primerler markır adayı olarak değerlendirilmiştir.

Hpmse031 SSR primerinden (Yi vd. 2006) elde edilen sonuçların TSWV'nin mevcut moleküler testlenmesinden elde edilen sonuçlar ile tutarlılık gösterdiği belirlenerek; ilgili primerin PCR amplifikasyon ürünleri agaroz jel ve Fragment Analyzer® sistemi kullanılarak görüntülenmiştir. 96 adet F4 kademesindeki biber bitkisinin dışında, farklı genetik altyapıda 381 adet biber genotipinde markır test edilmiştir. TSWV'ye dayanıklılığın moleküler testlenmesinde yeni geliştirilen markır enzim kesim basamaklarını ortadan kaldırdığı için işgücü, zaman ve maliyet açısından avantaj sağlayacaktır.

ANAHTAR KELİMELER: TSWV, SCAR, SCAC568, SRAP, SSR, Hpmse031

JÜRİ: Yrd. Doç. Dr. Hatice İKTEN (Danışman)
Prof. Dr. Nedim MUTLU
Yrd. Doç. Dr. Hasan PINAR

ABSTRACT

CONVERTING THE RESISTANCE LOCUS OF TOMATO SPOTTED WILT VIRUS (TSWV) IN PEPPER TO SCAR MARKER

Selcan SEVİNÇ SOLAK

MSc Thesis in Department of Agricultural Biotechnology
Supervisor: Asst. Prof. Dr. Hatice İKTEN
June 2016, 78 pages

Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) is one of the important plant virus diseases which limitates the pepper production in our country and the world. In this study, the development of the new marker(s) has been aimed in order to remove the disadvantages of the present molecular testing method which is used in breeding works to improve a type resistant to TSWV.

Totally 96 pepper plants on F4 rank have been used as study materials. By using SCAR marker developed by Moury et. al (2000), related gene spot has been multiplied and genotypes' resistance to TSWV at codominant level (RR, Rr, rr) after two seperate CAPS phase has been determined. In the first part of the study to develop new markers, totally 58 primer combinations have been tried by generating SCAC568 primer combinations with SRAP primers. In the second part of the study, 29 SSR primers most of which are mapped, and developed for pepper, have been used. The primers determined as polymorphic with Bulk Segregation Analysis method has been evaluated as marker candidates.

Stating that the results obtained from Hpmse031 SSR primer show consistency with the results from the present molecular testing of TSWV, PCR amplification products of the related primer have been viewed by using agarose gel and Fragment Analyzer system. Apart from 96 pepper plants on F4 rank, the trial of the marker has been practiced on 381 pepper genotypes at different genetic substructure. The marker newly developed at molecular testing of the resistance to TSWV will provide advantages in terms of work force, time and finance as it removes enzyme fraction steps.

KEYWORDS: TSWV, SCAR, SCAC568, SRAP, SSR, Hpmse031

COMMITTEE: Asst. Prof. Dr. Hatice İKTEN (Supervisor)
Assoc. Prof. Dr. Nedim MUTLU
Asst. Prof. Dr. Hasan Pınar

ÖNSÖZ

Mevcut tarımsal üretim alanları ve üretim yöntemleri ile önümüzdeki 20 yıl içerisinde artan dünya nufüsuna yetecek kadar gıda maddesi üretimi mümkün görülmemektedir. Kimyasal gübre, hastalık ve zararlılar için tarımsal mücadele ilacı kullanımı, mekanizasyon ve sulama teknikleri gibi yöntemler kısa süreli bitkisel üretimde artış sağlamasına rağmen çevre üzerinde önemli baskılar yaratmaktadır. Modern biyoteknolojik yöntemlerin klasik ıslah yöntemleri ile birlikte kullanılmasının kuraklık, tuzluluk, hastalık ve zararlılara dayanıklılık, besin içeriği iyileştirilmesi, verim ve kalite artışı gibi birçok açıdan büyük kolaylık sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada; biber yetiştirciliği yapılan alanlarda üretimi sınırlandıran domates lekeli solgunluk virüsüne dayanıklı çeşit geliştirilmesi amacı ile yapılan ıslah çalışmalarına işgücü, maliyet ve zaman açısından fayda sağlayacağı düşünüldüğü için moleküler yöntemlerden yararlanarak ve mevcut yöntemin dezavantajlarını ortadan kaldırmak için yeni markır(lar)ın geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasının hazırlanması sırasında yardımlarını esirgemeyen, her konuda bilgi ve tecrübesinin yanı sıra insani olarak hayatıma kattığı değerlerden dolayı danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Hatice İKTEN'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Laboratuar çalışmaları sırasında bilgi ve imkânlarını eksik etmeyen sayın hocalarım, Yrd. Doç. Dr. Cengiz İKTEN'e, Prof. Dr. Nedim MUTLU'ya ve bu çalışmayı maddi olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimine, çalışmanın bitkisel materyalini sağlayan Sürde Tarım-Proto Tohum LTŞ'ne, çalışmaya verdiği destek ve yardımları için Canseri BOZKUŞ'a, Sayın İbrahim ÇELİK ve Nejla ÇELİK'e, laboratuar çalışmalarım sırasındaki yardımları için Semra GÖNÜL'e, Özlem YÜCESAN'a ve Arş. Gör. Duygu SARI YOL'a teşekkür ederim.

Sevgi ve desteklerini hayatım boyunca hissettigim sevgili aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
ÖNSÖZ iii
İÇİNDEKİLER iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ vi
ŞEKİLLER DİZİNİ vii
ÇİZELGELER DİZİNİ viii
1. GİRİŞ 1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI 5
2.1. Biber (Capsicum annum L.) Hakkında Genel Bilgiler 5
2.2. Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV) Hakkında Bilgiler 6
2.2.1. Hastalık etmeni ile ilgili bilgiler 8
2.2.2. Hastalığın vektörü ile ilgili bilgiler 9
2.2.3. Hastalığın belirtileri ve mücadelesi 10
2.3. TSWV'ye Dayanıklılığın Klasik Yöntemlerle Testlenmesi 12
2.4. TSWV'ye Dayanıklılığın Moleküler Yöntemlerle Testlenmesi 13
2.5. Biber Çalışmalarında Kullanılan Moleküler Markırlar 14
3. MATERYAL ve METOT 17
3.1. Materyal 17
3.2. Metot 17
3.2.1. TSWV'nin saha şartlarında gözlemlenmesi ve hastalığa dayanıklılığın skorlanması 17
3.2.2. DNA izolasyonu 18
3.2.3. Moleküler testleme yöntemi ile genotiplerin TSWV'ye dayanımlarının belirlenmesi 18
3.2.4. Bulk segregasyon analizi (BSA) 20
3.2.5. SCAC568 X SRAP kombinasyonları ile PCR amplifikasyonu 20
3.2.6 Simple sequence repeat (SSR) primerleri ile PCR amplifikasyonu 22
4. BULGULAR 25
4.1. Arazi Koşullarında Yapılan Fiziksel Gözlem Sonuçları 25
4.2. Moleküler Testleme 25
4.3. SCAC568 ve SRAP Primerleri Kombinasyonu ile PCR Amplifikasyonu 28
4.4. SSR Primerleri ile PCR Amplifikasyonu 29
5. TARTIŞMA 39
6. SONUÇ 42
7. KAYNAKLAR 44
8. EKLER 61

EK 1. P1 33-80 numaralı örneklerin Xba ve TaqI enzimleri ile kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....61
EK 2. P1 96 örnek Hpmse031 primeri PCR amplifikasyon ürünleri agaroz jel görüntüsü 62
EK 3. P1 96 örnek SCAC568 ve Hpmse031 markırlarından elde edilen moleküler sonuçlar.....63
EK 4. P2 40 örnek Xba ve TaqI enzimleri ile kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü…….64
EK 5. P2 40 örnek Hpmse031 primeri PCR amplifikasyon ürünleri agaroz jel görüntüsü 65
EK 6. P2 40 örnek SCAC568 ve Hpmse031 markırlarından elde edilen sonuçların moleküler karakterizasyonu.....66
EK 7. P3 15 örnek, Xba ve TaqI enzimleri ile kesim ürünlerinin ve Hpmse031 primeri PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel görüntüleri.....67
EK 8. P3 15 örnek SCAC568 ve Hpmse031 markırlarından elde edilen sonuçların moleküler karakterizasyonu.....68
EK 9. P4 52 örnek Xba ve TaqI enzimleri ile kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü…….69
EK 10. P4 52 örnek Hpmse031 primeri PCR amplifikasyon ürünleri agaroz jel görüntüsü…….....…….70
EK 11. P4 52 örnek SCAC568 ve Hpmse031 markırlarından elde edilen sonuçların moleküler karakterizasyonu.....71
EK 13. P5 82 örnek Xba ve TaqI enzimleri ile kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü…….72
EK 12. P5 82 örnek Hpmse031 primeri PCR amplifikasyon ürünleri agaroz jel görüntüsü 73
EK 13. P5 82 örnek SCAC568 ve Hpmse031 markırlarından elde edilen sonuçların moleküler karakterizasyonu.....74
EK 14. P6 96 örnek Xba ve TaqI enzimleri ile kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü…….75
EK 15. P6 96 örnek Hpmse031 primeri PCR amplifikasyon ürünleri agaroz jel görüntüsü 76
EK 16. P6 96 örnek HpmsE031 primeri ile PCR amplifikasyon ürünleri Fragment Analyzer™ görüntüsü.....77
EK 17. P6 96 örnek SCAC568 ve Hpmse031 markırlarından elde edilen moleküler sonuçlar.....78
ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

bp	Base pair
cM	centiMorgan
cm	Santimetre
°C	Santigrad derece
g	Gram
m	Metre
µL	Mikrolitre
ml	Mililitre
Kb	Kilo base
kDa	Kilodalton
M	Molar
Mbp	Mega base pair
sa	Saat

Kısaltmalar

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
BSA	Bulk Segragant Analysis
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynucleotide Triphosphate
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
HR	Hypersensitive Reaction
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
MAS	Marker Aided Selection
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QTL	Quantitative Trait Loci
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region
SRAP	Sequence Related Amplified Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeat
TBE	Tris-Borate-EDTA
TSWV	Tomato Spotted Wilt Virus
UV	Ultraviolet

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. 568 bp büyüklüğündeki ilgili gen bölgesinin çoğaltılması……..…….25

Şekil 4.2. 96 adet genotipin PCR ürünlerinin Xba enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü……...……...……..26

Şekil 4.3. 96 adet genotipin PCR ürünlerinin TaqI enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü……...……...……..26

Şekil 4.4. Polimorfik SCAC568-SRAP kombinasyonlarının DNA bulklarına ait agaroz jel görüntüleri……...……...……...…….26

Şekil 4.5. Monomorfik SSR primerlerinden Caes0089(A) ve CAMS-101(B) e ait agaroz jel görüntüsü……...……...……..……30

Şekil 4.6. CAMS-020 primerinin bulklardaki agaroz jel görüntüsü…….…..…….....31

Şekil 4.7. CAMS-020 primerinin 96 genotipe ait agaroz jel görüntüsü…….…...….31

Şekil 4.8. CAMS327 primerinin bulklarda agaroz jel görüntüsü…….…….....32

Şekil 4.9. CAMS327 primerinin 96 genotipe ait agaroz jel görüntüsü……...……..….32

Şekil 4.10. Gpms 159 primerinin bulklarda agaroz jel görüntüsü……...……33

Şekil 4.11. Gpms 159 primerinin 1-64 arasındaki genotiplere ait agaroz jel görüntüsü.33

Şekil 4.12. HpmsE031 primerinin bulklarda agaroz jel görüntüsü…….....34

Şekil 4.13. HpmsE031 primerinin 96 genotipe ait agaroz jel görüntüsü……...…..34

Şekil 4.14. HpmsE031 markırının BLAST analizi sonuçları……..……37

Şekil 4.15. Fragment Analyzer™ ile yapılan analiz sonrasında HpmsE031 markırının 48 adet genotipe ait sanal jel görüntüsü…...……...……...…..38

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. SCAC568 ileri ve geri primerlerinin nükleotit dizilimi……..…..18

Çizelge 3.2. PCR tepkime karışımında kullanılan miktarlar ve PCR döngüsü….....…19

Çizelge 3.3. SCAC568 primeri ile elde edilen PCR ürünlerinin kesimi……....19

Çizelge 3.4. SRAP ve SSR markır sistemlerinde kullanılan DNA bulkları.....20

Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan SRAP primerleri nükleotit dizilimi…….……...….21

Çizelge 3.6. SRAP-SCAC568 kombinasyonları için PCR tepkime karışımında kullanılan miktarlar ve PCR döngüsü……...…….....21

Çizelge 3.7. Kullanılan SSR primerlerinin nükleotit dizilimi.....22

Çizelge 3.8. SSR için PCR tepkime karışımında kullanılan miktarlar ve PCR döngüsü……...…...……..…...……...23

Çizelge 4.1. Fiziksel gözlem ve SCAC568 moleküler testleme sonuçları.....27

Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan SSR primerleri ve PCR sonuçları……..…..……..29

Çizelge 4.3. SCAC568 primeri ve polimorfik SSR primerlerinden elde edilen sonuçlar….....…...……...…….....36

Çizelge 4.4. SCAC568 ve Hpmse031 markırlarından elde edilen sonuçların moleküler karakterizasyonu…….……...38

1. GİRİŞ

Bitki virüs hastalıkları birim alandan sağlanan verimi düşürmek ve kaliteyi bozmak suretiyle önemli boyutlarda ekonomik kayıplara neden olmaktadır ve ekonomik kayıpların önüne geçme çabaları uzun yıllardan bu yana insanlığın uğraşı alanını oluşturmuştur (Çandar ve Erkan 2011). Virüslerin çok sayıda konukçusu ve ırklarının bulunması, çok farklı taşınma şekillerinin olması, diğer bitki patojenlerinden farklı olarak, etkili bir kimyasal kontrolü olmamasından dolayı virüs hastalıkları ile mücadele oldukça zordur (Şevik 2011).

Dünya'da bitki virüslerinden kaynaklanan toplam zarara ait kesin rakamlar bulunmamaktadır. Çünkü yıldan yıla, mevsimden mevsime, bölgeden bölgeye, üründen ürüne değişiklik göstermektedir (Şevik 2011). Ancak bazı farklı ürünlerde virüsler nedeni ile oluşan zarar ve kayıplar ile ilgili tahmini veriler mevcuttur. Viral hastalıklardan kaynaklanan kayıpların minimize edilmesi amacı ile farklı mücadele yöntemleri kullanılmaktadır ancak; kullanılan yöntemlerin çoğu virüs infeksiyonlarından korunmaya yönelik olup, uygulaması zordur. Bitkisel üretimin devamlılığının sağlanması için dayanıklı çeşit kullanımının gerekliliği vurgulanmış ve ekonomik, pratik, çevre dostu olduğu belirtilmiştir (Varma 1993).

Hastalık etmeni ile karşılaşan bitkinin, etmen tarafından oluşturulacak infeksiyona karşı gösterdiği dayanma gücüne 'dayanıklılık' adı verilmektedir. Bitkilerde görülen dayanıklılık reaksiyonları, infeksiyon öncesi dayanıklılık ve uyarılabilir dayanıklılık olarak iki grupta toplanmaktadır (Huang 1985). İnfeksiyon öncesi dayanıklılık (pasif dayanıklılık) bitkilerin kalıtımsal olarak sahip olduğu yapısal, kimyasal ve morfolojik faktörlerden kaynaklanmaktadır (Hammerschmidt 2007). Uyarılabilir dayanıklılık (aktif dayanıklılık) ise genler tarafından sağlanmaktadır ve zararlı saldırısından sonra aktifleşmektedir (Hammerschmidt 2007). Dayanıklılık genleri, patojene karşı dayanıklılığı kontrol eden yapısal proteinlerdir (Staskawicz vd 1995) ve nesilden nesile aktarılabildiği, ıslah ve genetik mühendisliği çalışmalarıyla dayanıklı bitki elde etme programlarında kullanılabildiği (Çandar ve Erkan 2011), doğal ya da yapay yöntemlerle sonradan kazandırılabildiğinin (Lalanne 1966) anlaşılmasından sonra, bitki virüslerine dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi en etkili ve basit yaklaşımlardan olmuştur.

Bitki ve patojen genlerinin arasındaki genetik interaksiyonların araştırılması sonucu; dayanıklılığın sadece bitkiden kaynaklanmadığı patojen genomunun da etkili olduğu belirlenmiş olup; dayanıklılık geni ile patojen geni arasındaki ilişkiye 'gen için gen' adı verilmiştir (Flor 1971). Bitki patojeninin sahip olduğu avirülens (avr) genlerin elisitör proteinleri kodladığı, bitkinin sahip olduğu dayanıklılık genleri (R) tarafından kodlanan reseptör proteinlerinin patojenin varlığını anlayarak savunma mekanizmasını aktive ettiği belirlenmiştir (Çalış 2011). Bu aktivasyon sonrasında, hipersensitif reaksiyon (HR) oluşturmak sureti ile (virüsün infeksiyon yaptığı bölgenin etrafını saran hücrelerde programlı hücre ölümleri) patojenin yayılması engellendiği Flor tarafından (1971) ortaya konulmuştur. Dayanıklılık genlerinin patojen ile interaksiyonunun yapısının anlaşılmasının hastalıklara sürekli dayanıklılığın sağlanması için önemli olduğu vurgulanmıştır (Lefebvre ve Chevre 1995).

Dayanıklılık genleri kalıtsal olarak, monogenik (tek gen), oligogenik (birkaç gen) ve poligenik (çokgen) olabilmektedir (Lefebvre ve Chevre 1995). Günümüze kadar, farklı bitki patojenlerine karşı tanımlanan dayanıklılık genlerinin büyük bir kısmının monogenik dominant dayanıklılık ortaya koyduğu Maule vd (2007) tarafından belirlenmiştir ve diğerlerine göre basit ve sonuç elde edilmesi daha kolaydır. Oligogenik veya poligenik dayanıklılık çevre koşullarından etkilenmektedir ve bu yüzden daha karmaşıktır (Mather ve Jinks 1971). Kantitatif özellik lokusu ya da QTL (Geldermann 1975) aynı hastalığa karşı dayanıklılık sağlayan genlerin ve kromozomlar üzerindeki yerlerinin belirlenmesine olanak sağlamaktadır (Lefebvre ve Chevre 1995). Üzerinde çalışılan dayanıklılık genleri ile ilgili markır veya gene özgü primerler kullanılarak ebeveynler ve ıslah sonucu elde edilen bireyler (F1, F2 vb) fide döneminde PCR ile hızlı ve güvenli bir şekilde belirlenebilmektedir; moleküler markırlardan bu şekilde yararlanılmasına ıslah programlarında 'Markır Destekli Seleksiyon (MAS)' adı verilmektedir (Devran 2006).

MAS klasik ıslah metotlarının başarısının, hızının arttırılması için gerekli tekniklerin başında yer almaktadır. Birçok bitki türünde verim, kalite, hastalık ve zararlılara dayanıklılık gibi konularda MAS'dan yararlanılmaktadır. Erken seleksiyonla ıslah süresinin kısaltılabilmesi, geriye melezleme ile dayanıklılığın aktarılmasında, genler arasındaki bağlantının (linkage) kırılmasında ve taranması zor olan özelliklerin belirlenmesinde kolaylık sağlamaktadır. Bunların yanı sıra; karantina kapsamındaki bazı hastalık ve zararlılara dayanıklılık için testlemeye gereksinimin olmaması, dolayısıyla daha az sayıda bitki ile çalışmaya imkân sağlayarak iş gücü ve maliyet bakımından avantajlı olması nedeni ile günümüzde yoğun olarak kullanılmaktadır (Pınar vd 2013).

Moleküler markırler DNA seviyesindeki değişiklikleri içerir ve genelde iki birey arasında DNA seviyesindeki farklılığın ortaya çıkarılmasına yardımcı olur. Moleküler markır yöntemlerinin her biri avantaj ve dezavantajlar içerir. Bu nedenle markır analizlerinin seçimi; polimorfizm seviyesi, populasyon tipi, lokus sayısı, kullanım kolaylığı, maliyeti ve laboratuvar alt yapısı gibi kriterler göz önünde bulundurulup amaca uygun olarak yapılmalıdır (Gülşen ve Mutlu 2005). Bu doğrultuda, DNA-DNA hibridizasyonu temelli (RFLP) ve PCR temelli (RAPD, SSR, ISSR, AFLP, SRAP vb.) yöntemlerden yararlanılmaktadır.

SRAP (Sequence Releated Amplified Polymorphism) Li ve Quiros (2001) tarafından geliştirilmiş, PCR temelli dominant markır sistemidir. SRAP primerleri 17-18 nükleotitden meydana gelmekte, bunlardan bir tanesi ileri (forward) diğeri ise geri (reverse) olarak görev yapmaktadır ve bu primerler ile doğrudan gen bölgeleri çoğaltılmaktadır. Primer 13-14 nükleotitden oluşan çekirdek kısmı ile bunu takip eden 3 seçici nükleotitden oluşmaktadır. Primerin başındaki 10 veya 11 nükleotitden sonra gelen dört nükleotit dizini ileri primerinde CCGG dizinine; geri primerinde AATT primer dizinine sahiptir. SRAP primerleri genomdaki açık okuma bölgeleri dediğimiz (ORFs) bölgelerini çoğaltır ve daha önce yapılan çalışmalarda polimorfizm oranlarının yüksek olduğu tespit edilmiştir (Budak vd 2004, Mutlu vd 2008, Xu vd 2014).

SRAP markır sisteminden diğer dominant markır sistemlerinde olduğu gibi tür içi ve türler arası hibrit populasyonlarda (Hale vd 2007) taksonomik düzeyde genetik varyasyonların değerlendirilmesinde (Uzun vd 2009), linkage haritalarının

oluşturulmasında (Lin vd 2003, 2009, Yeboah vd 2007, Levi vd 2011, Guo vd 2012) ve kantitatif özellik lokuslarının (QTL) belirlenmesinde (Chen vd 2007, Yuan vd 2008, Zhang vd 2009) yararlanılmıştır.

SSR (Simple Sequnce Repeat) tekniği polimorfizm seviyesi (Litt ve Luty 1989) ve güvenilirliği yüksek olmakla beraber, üzerinde çalışılan genomla ilgili tekrarlanan baz dizilerinin belirlenmesi ve bunların primer olarak kullanılabilmesi için ön çalışma gerektirmektedir. Bu nedenle maliyeti yüksektir ancak; öteki PCR'a dayalı tekniklere göre daha fazla bilgi içermektedir (Powell vd 1996a). Basit Tekrarlı Diziler olarak adlandırılan SSR primerleri tekrarlanan kısa nükleotid dizilimlerinin (1-6) (Gupta vd 1996, Thiel vd 2003) genomda bulunma durumu ve tekrarlanma sayılarındaki farklılığa bağlı olarak genotipler arasındaki polimorfizmi belirlemektedir. Sayıları (n) 10 ile 80 arasında değişen (A)n, (AT)n, (AAT)n, (GA)n ve (AAG)n dizileri bitkilerde en yaygın şekilde bulunmaktadır (Tautz 1989, Akkaya vd 1992). SSR'lar genom üzerinde lokuslarının sabit olması ve çok sayıda bulunabilmeleri, kodominant yapıları, yüksek oranda polimorfizm göstermeleri ve otomatik analiz sistemlerine uygun olmaları nedeniyle markır geliştirme çalışmalarında tercih edilmektedir.

Solanaceae familyasından domates, patates ve patlıcan'da SSR markırları kullanılarak genetik haritalama çalışmaları yapılmış (Broun ve Tanksley 1996, Smulders vd 1997, Milbourne vd 1998, Nunome vd 2003) olup; bu türler arasında yakın filogenetik akrabalık bulunmasına rağmen geliştirilen SSR markırların *Capsicum* türlerinde kullanılamadığı belirtilmiştir (Minamiyama vd 2006). Lee vd (2004) tarafından türler arası melezleme ile (*C. annuum* 'TB68' X *C. chinense* 'Habanero') SSR markırları kullanılarak bağlantı haritası oluşturulmuştur. Mikrosatelit lokusların 'SNU-RFLP' bağlantı haritasına yerleştirilmiş ve oluşturulan harita 'SNU2' olarak adlandırılmıştır. Onbeş bağlantı grubunun 46 SSR ve 287 RFLP markırı ile oluşturulduğu, biber genomunun 1,761.5 cM lık kısmının haritalandığı belirtilmiştir (Lee vd 2004).

Dünya'da ve ülkemizde biber üretimini sınırlandıran ve ekonomik kayıplara neden olan virüs hastalıklarının en önemlilerinden bir tanesi 'Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV)' dür. İlk olarak 1915 yılında Avustralya'da rapor edilmiştir (Brittlebank 1919). Thripslerle taşındığı (Pittman 1927) ve hastalık etmeninin virüs olduğunun tespitinden sonra; domates lekeli solgunluk virüsü olarak adlandırılmıştır (Samuel vd 1930). Dünya'da konukçusu olduğu bitkilerde ortalama 1 milyar dolarlık ekonomik zarara neden olduğu belirtilmiştir (Goldbach ve Peters 1994).

TSWV ile mücadelede fiziksel ve biyolojik yöntemlerin yetersiz kalması (Rosello vd 1996), kimyasal yöntemlerin etkinliğinin düşük olması ve thripslerin kullanılan piretroidler, karbamatlar, organik fosforlular ve abamektin içerikli insektisitlere karşı direnç geliştirmeleri (Ie 1970, Cho vd 1989, Rice vd 1990), kullanılan kimyasalların bitkisel ürünlerde kalıntı oluşturabilmesinin yanı sıra insan ve

çevre sağlığına vermiş olduğu zararlar nedeni ile dayanıklı çeşit kullanımının önemi gün geçtikçe artmaktadır.

Kültürü yapılan biber türlerinin çoğunluğunu oluşturan *Capsicum annuum'*da TSWV'ye dayanıklılık genine (*Tsw*) rastlanmamıştır. Dayanıklılık kaynağı *C. chinense* Jacq. olup; en az beş farklı *C.chinense* hattının dayanıklılık sağladığı bildirilmiştir ('PI152225', 'PI 159236', 'CNPH 275', 'C00943','7204'). Biberde TSWV'ye dayanıklılığın dominant tek gen (*Tsw*) tarafından kontrol edildiği belirlenmiştir ve 10.kromozomda haritalanmıştır. (Boiteux 1995, Jahn vd 2000). Daha sonra yapılan markır geliştirme çalışmalarda *Tsw* lokusuna bağlı RAPD markırı elde edilmiş ve CAPS markırına dönüştürülerek (SCAC568) ıslah programlarında moleküler testlemelerde kullanılmaya başlanmıştır (Moury vd 2000). Ancak bu amaçla geliştirilen SCAC568 markırı ile yapılan testlemeler sonucu elde edilen bilgiler dayanıklılık lokusunda bulunan ve SCAC568 primeri ile çoğalan hassas analog gen bölgelerinin varlığı nedeniyle bazı biber hatlarında yanıltıcı olabilmektedir. Bu nedenle dayanıklılığın tespiti original çalışmada belirtildiğinin yanısıra ekstra ikinci bir restriksiyon enzim kesimi gerektirmekte ve zaten fazla olan iş gücünü ve malzeme gereksinimi ikiye katlamaktadır (İkten vd 2010). Güvenilir moleküler testlemenin iki ayrı CAPS aşaması gerektirmesi nedeniyle yapılabilecek hata oranını arttırmaktadır. Bunun yanısıra, ortaya konulan moleküler verilerin doğru yorumlanmasında da hatalar oluşabilmektedir.

Bu çalışmada, TSWV'ye dayanıklılığın moleküler testlemesinde yaşanan olumsuzlukların giderilebilmesi için; SRAP X SCAC568 primerleri kombinasyonları oluşturarak; mevcut moleküler testleme yönteminde kullanılan primer çiftinin (SCAC568 F,R) çoğalttığı bölgeden yararlanmak ve biber için geliştirilmiş SSR primerlerini kullanarak yeni markır/markırların geliştirilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen markır ile yapılan testlemelerde halen kullanılan metotta yer alan enzimlerle kesim basamağına gerek kalmayarak sadece PCR ile testleme tamamlanabileceği için yeni testleme metodu önceki metottan hızlı, güvenilir ve daha ekonomik olacaktır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Biber (Capsicum annum L.) Hakkında Genel Bilgiler

Biber; domates, patates, tütün ve petunya'nın dâhil olduğu *Solanaceae* (patlıcangiller) familyasından *Capsicum* cinsine ait olup ılık iklimlerde tek yıllık, tropik iklimlerde ise çok yıllık olarak yetiştirilen kültür bitkisidir. Dünya'da yetiştirildiği alanların fazlalığı, farklı kullanım alanları ve çok sayıda farklı tür içermesinden dolayı (Palloix 2003) aynı familyadaki domatesten sonra ikinci önemli sebze türüdür.

Biberin anavatanının Orta ve Güney Amerika olduğu bilmesine karşılık, yapılan taksonomik çalışmalar sonrasında biber orijinlerinin türlere göre farklılık gösterdiği ortaya konulmuştur. Amerika'nın keşfinden önce diğer kıtalarda bilinmezken 15.yy. ın sonlarına doğru K. Kolomb tarafından Avrupa'ya getirilmiş, daha sonra Afrika, Hindistan ve Çin'e yayılmıştır. Ülkemize ilk biber çeşitleri 16. yy. da Osmanlı İmparatorluğu döneminde gelmiştir (Vural vd 2000).

Capsicum türlerinin meyve şekli (oval, yuvarlak, uzun, yassı, silindirik, küre), büyüklüğü, rengi (sarı, kırmızı, yeşil), aroması, acılığı gibi morfolojik farklılıkları taze, kurutulmuş, baharat gibi farklı şekillerde tüketilmesine olanak sağlamaktadır (Govindarajhan 1987). Süs bitkisi olarak kullanımının yaygınlaştığı Palloix vd (2003) tarafından belirtilmiştir. Acı biberlerin içerdiği kapsaisin alkoloidinin kanserli hücreleri öldürdüğü tespit edilmiş olup; ilaç sanayinde, kırmızıbiberin içerdiği capsorubin, capsonthin, zeaxantin ve karotin gibi renk maddeleri nedeni ile boya sanayinde kullanılmaktadır. Biber meyvesindeki yüksek C vitaminin yanı sıra A, B, E ve K vitaminleri ile insan beslenmesinde önemli yer tutmaktadır.

Capsicum genusu içerisinde 30 farklı tür bulunmakla beraber; *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum* ve *C. pubescens* (Eshbaugh 1980, IBPGR 1983) kültürü yapılan türleri oluşturmaktadır. Meksika, Afrika, Asya'da yetiştirilen acı biberlerin ve ılıman iklim kuşağındaki tatlı biberlerin çoğu *C. annuum* türüne ait olup; Dünya'da en fazla yetiştirilen ve en bilinen türdür. *C. annuum*'un Latin Amerika gibi nemli olan bölgelere adaptasyonu düşük olduğundan; *C. frutescens* ve *C. chinense* bu bölgelerde tercih edilmektedir. Kültürü yapılan 5 türün, yetiştirildiği alanlara ve tüketim şekillerine göre farklılıklar gösterdiği Pickersgill (1997) tarafından belirtilmiştir.

Capsicum türleri kromozom sayılarına göre 2n=24 ve 2n=26 olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Sadece *C. annuum var. glabriusculum* türünün tetraploid (2n=4x=48) olduğu belirlenmiştir (Pickersgill 1977). Haploid genom büyüklüğü 2702- 3420 Mbp (Galbraith vd 1983) olup; domates, patates, patlıcandan 3-4 kat, *Arabidopsis thaliana* dan 20 kat daha büyüktür.

Capsicum'un mevcut genetik kaynaklarını korumak, türlerinin devamlılığını sağlamak, yeni çeşitlerin ve genetik varyasyonların oluşturulabilmesi için dünyanın farklı yerlerinde gen havuzları kurulmuştur. Avrupa'da yedi farklı araştırma merkezinde *Capsicum*'un 12,000 aksesyonunun varlığı (Daunay vd 2001) ve Türkiye'nin *Capsicum annuum* L. türü için bir mikro gen merkezi olduğu Küçük (2001) tarafından belirtilmiştir.

Tohum endüstrisi ve tescilli F1 hibritlerin sayısındaki önemli artış nedeni ile biberin mevcut genetik çeşitliliğinden yararlanarak verimin ve meyve kalitesinin arttırılması, soğuğa toleranslı, hastalıklara dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi ıslah yönünden önemlidir. Yabani türler birçok hastalık etmenine karşı dayanıklılık genleri içerdikleri için çok önemlidir. Biberde üretimi sınırlandıran virüs hastalıklarına karşı dayanıklılık genleri *Capsicum annuum* ve bazı yabani biber türlerinde tespit edilmiştir. *C. annuum*, *C. chinense* ve *C. chacoense* 'nin L lokusundaki farklı allellerinin Tobamovirüslere (TMV ve PMMoV) (Boukema 1982, Rast 1988), *C. chinense'* nin TSWV'ye (Boiteux 1995), *C. annuum* ve *C. chinense*'nin Potyvirüslere (PVY, PepMoV, PVMV) (Boiteux vd 1996, Caranta vd 1996, Kyle ve Palloix 1997) karşı dayanıklılık genleri içerdikleri belirlenmiştir. *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. baccatum*'da ise hıyar mozaik virüsü'ne (CMV) kısmen dayanıklılık tespit edilmiştir (Ben Chaim vd 2001, Grube vd 2000, Monma ve Sakata 1997, Suzuki vd 2003).

2.2. Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV) Hakkında Bilgiler

Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV) ilk olarak 1915 yılında Avustralya'da domates bitkisinde rapor edilmiştir (Brittlebank 1919). Hastalık ilk olarak Avustralya'nın güney batısında rapor edilmiş olup, çok kısa sürede Avustralya'nın tüm bölgelerine ve Dünya'ya yayıldığı Best tarafından (1968) bildirilmiştir. Thripslerle taşındığı (Pittman 1927) ve hastalık etmenin virüs olduğunun tespitinden sonra; 'Tomato Spotted Wilt Virus' olarak adlandırılmıştır (Samuel vd 1930).

TSWV'nin 1968'de 150 (Best 1968), 1994'de 650 (Goldbach ve Peters 1994), 2003'de monokotilon 15, dikotilon 69 bitki familyasından, acı bakla, çobançantası, ebegümeci gibi yabancı otlar, kadife çiçeği, zinya çiçeği, kasımpatı, yıldız çiçeği, gerbera gibi süs bitkileri, domates, biber, yer fıstığı, tütün, soğan gibi birçok sebze türü dâhil olmak üzere yaklaşık 1100 bitki türünde (Parella vd 2003) hastalığa neden olduğu ve Dünya'da konukçusu olduğu bitkilerde ortalama 1 milyar dolarlık ekonomik zarara neden olduğu (Goldbach ve Peters 1994) bildirilmiştir.

Hastalığın vektörü olan thripslerin (Thysanoptera: Thripidae); 0,5-5 mm uzunluğunda küçük canlılar olmaları, polifag beslenmeleri (sebze, süs bitkileri, yabancı otlar, meyve ağaçları), yüksek üreme kabiliyetleri (Morse ve Hoddle 2006) ve kullanılan insektisitlere direnç geliştirmeleri mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Yumurtalarını yaprak dokusuna bırakmaları, larvalarının çiçeklerde, pupalarının

toprakta bulunması uluslararası ticaret ile Dünya'da yayılmalarını kolaylaştırmıştır. Avrupa'da ilk olarak 1929'da İngiltere'de TSWV rapor edilmiştir. *Thrips tabaci* hastalığın vektörü olarak kaydedilmiş olup; o tarihlerde kimyasal mücadele ile kontol altına alınabildiği belirtilmiştir (Pappu vd 2009).

Hastalığın vektörlerinden biri olan *F. occidentalis*in 1980'lerin başında Batı Amerika'dan Avrupa'ya bulaşması ile İtalya (Vaira vd 1993), Fransa (Marchoux vd 1991) ve İspanya'da (Jorda 1993) salgın boyutunda enfeksiyon oluşturduğu rapor edilmiştir.

Hawaii'de ananas yetiştiriciliği yapılan alanlarda ilk olarak 1926' da TSWV'ye rastlanmıştır. 1960'da ise domates ve marulda çok fazla ürün kayıplarına neden olduğu belirtilmiştir. Tazmanya'da 1982'de ilk olarak patateste (Sampson ve Walker 1992), 1987'de ise Kuzey İspanya'da kavun, domates, biber bitkilerinde önemli derecede üretimi kısıtladığı (Jorda ve Osca 1991, Moriones vd 1998), Arjantin'de ise 1990 yılında domates, biber ve marul yetiştirilen alanlarda hastalığın salgın boyutunda olduğu belirtilmiştir (Gracia vd 1999).

TSWV, ülkemizde ilk olarak Çanakkale'de tütün bitkisinde ve bunu takiben Balıkesir, Manisa, Uşak ve Samsun'da görülmüştür (Azeri 1981). Domateste 1995 yılında Güldür vd tarafından Akdeniz Bölgesinde Mersin ili ve çevresinde teşhis edilmiştir. Yürtmen vd (1999), biberde Mersin'in Kazanlı bölgesinde TSWV varlığını tespit etmişleridir.

Tekinel vd (1969), Çukurova'da yaptıkları araştırmada marul bitkisinde TSWV olabileceğine dair bulgular elde etmişlerdir. Kamberoğlu ve Alan (2010), Çukurova'da TSWV'nin marul yetiştirilen alanlarda varlığını ve görülme sıklığını belirlemek amacı ile Adana-Mersin illerinde 400.000 bitkide gözlemlerde bulunmuşlardır ve TSWV simptomları gösteren 336 bitkiyi ELISA testi ile testlemişlerdir. Pozitif sonuç elde edilen örnekler ile sRNA'ya spesifik primerler kullanılarak RT-PCR yapılmıştır ve testlenen bitkiler arasında TSWV görülme oranını %1.2 olarak bulmuşlardır.

Arlı Sökmen vd (2005), Samsun ilinde biber yetiştiriciliği yapılan alanlarda birçok virüs hastalığının varlığını rapor etmişlerdir. 1998 ve 1999 yılları arasında 313 örnek toplanarak ELISA ile testlenmiş ve virüslerin teşhisi yapılmıştır. Tütün mozaik virüsü (TMV), Domates mozaik virüsü (ToMV), Patates Y virüsü (PVY), Hıyar mozaik virüsü (CMV), Alfalfa mozaik virüsü (AMV) ve domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV) olmak üzere toplanan örneklerde 6 adet virüs türü tespit edilmiştir. Onbeş farklı familyadan 24 yabancı ot türünün testlenmesi ile 16 tanesinin en az bir virüs türü ile bulaşık olduğu belirlenmiş ve *Hibiscus trionum* (Venice mallow)' un TSWV ve PVY'nin yeni konukçusu olduğu belirtilmiştir. Biber yetiştiriciliği yapılan alanlarda yabancı otların varlığı virüs infeksiyonlarının oluşma riskini arttırdığı rapor edilmiştir (Arlı Sökmen vd 2005).

Yardımcı ve Kılıç (2009), Batı Akdeniz bölgesinde 2006-2007 üretim sezonunda sebze yetiştiriciliği yapılan alanlarda TSWV'nin varlığını ve görülme oranını tespit ettikleri çalışmada; TSWV simptomlarını gösteren domates, biber, patates, marul, kabak ve hıyar yapraklarını çalışma materyali olarak kullanmışlardır. Oniki lokasyondan 337 örneği toplayarak DAS-ELISA testi ile testlemişler ve test sonuçlarına göre 157 örneğin TSWV ile bulaşık olduğu ve %46.58 görülme sıklığı belirlemişlerdir. Biberde %67.16, marulda %66.66, domatesde %46.94 ve kabakda %16.66 oranında TSWV infeksiyonu gözlemlemişlerdir. Çalışmanın yapıldığı süre içerisinde Thripslerin baskın olduğu gözlemlenmiş ve vektörü *Frankliniella occidentalis* Pergande olarak teşhis etmişlerdir. TSWV pozitif örneklerden hazırlanan ekstrakt ile bazı bitkilerde mekanik inokülasyon gerçekleştirmişlerdir. Mekanik inokülasyon sonrası *Catharanthus roseus* da yaprak deformasyonu ve mozaik lekeler, *Pelargonium zonale* de normal gelişimin durması ve bitkilerde ölüm, *Nicotiana glutinosa* ve *Nicotiana tabacum White Burley* de yaprak deformasyonu, yaprak damarlarda sararma, mozaik lekeler ve nekrotik local belirtilerin oluştuğunu tespit etmişlerdir.

2.2.1. Hastalık etmeni ile ilgili bilgiler

Hastalık etmeni (TSWV) *Bunyaviridae* familyasından *Tospovirüs* cinsine dâhildir. Tospovirüslerin bu familyadan bitkilerde infeksiyon oluşturan tek cins (Uhrig vd 1999, Şevik 2007) olduğu ve *Bunyavirus, Phylebovirus, Nairovirus, Hantavirus* cinslerinin ise hayvanlarda infeksiyon oluşturduğu belirtilmiştir (Elliot 1990, Francki vd 1991). Tospovirüsler; nükleotit ve aminoasit dizilimi, serolojik özellikleri, vektör, konukçularına göre (Goldbach ve Kuo 1996, Jain vd 1998) 20 türe (Şevik ve Tohumcu 2010) ayrılmıştır. Impatiens necrotic spot virüs (INSV), Tomato chlorotic spot virüs (TCSV), Groundnut ringspot virüs (GRSV), Watermelon silver mottle virüs (WSMV) bu türlerden bazılarıdır.

TSWV partiküllerinin genişliği 80-110 nm çapında küreye benzer şekilde olduğu (Mohammed 1973) ve %5 nükleik asit (RNA), %70 protein, %20 lipid ve %5 karbonhidrat içerdiği belirtilmiştir (Le 1970, Adkins 2000, Şevik 2007). TSWV genomu 3 parçalı olarak belirlenmiş ve büyüklüklerine göre; Small (S), Medium(M) ve Large (L) RNA dan oluşmaktadır (Rosello vd 1996). L RNA (8.9 kb) negatif kutuplu genom organizasyonuna sahip iken, mRNA (5.4 kb) ve sRNA (2.9 kb) ambisense genom organizasyonuna sahiptir (Hull 2002).

TSWV genomunda 6 protein 5 farklı ORF (open reading frame= açık okuma çerçevesi) bölgesinden kodlanmaktadır. L RNA tek ORF bölgesinden viral replikasyon ve genome transkripsiyonu için gerekli olan RNA-dependent polymerase (RdRp) sentezlemektedir (Whitfield vd 2005). mRNA iki ORF bölgesinden viral partiküllerin hücreden hücreye taşınmasında görevli olduğu düşünülen NSm proteinini (36 kDa) ve virüs membranını oluşturmakla görevli Gn, Gc glikoproteinlerinin ön maddesini (127.4 kDa) kodlamaktadır (Cortez vd 2001). sRNA dan iki adet protein sentezlenmektedir.

Bunlardan ilki NSs (52.4 kDa) proteini olup işlevi tam olarak anlaşılamamıştır. Diğer protein ise nükleokapsit (N) proteini (29 kDa) olup, virion kılıfın oluşturulmasında görevlidir (Cortez vd 2001). sRNA'nın *Tsw*'ye dayanıklılığın kırılmasında genetik belirleyicileri içerdiği de Jahn vd tarafından (2000) belirlenmiştir ancak; avirülens faktörler halen açıklanamamıştır.

2.2.2. Hastalığın vektörü ile ilgili bilgiler

TSWV'nin thripsler (*Thysanoptera*:*Thripidae*) ile persistent ve sirkülatif olarak taşındığı belirtilmiştir (Whitfield vd 2005). Dünya'da *Frankliniella, Thrips, Scirtothrips, Ceratothripoides, and Dictyothrips* (Jones 2005, Pappu vd 2009) cinslerine dâhil 14 farklı thrips türünün (*Frankliniella occidentalis* Pergande, *Thrips tabaci* Lindeman, *F. schultzei* Trybom, *Ceratothripoides claratris* Shumsher, *F. bispinosa* Morgan, *F. cephalica* Crawford, *F. fusca* Hinds, *F. gemina* Bagnall, *F. intonsa* Trybom, *F. zucchini* Nakahara& Monteiro, *Thrips palmi* Karny, *T. setosus* Moulton, *Scirtothrips dorsalis* Hood, ve *Dictyothrips betae* Uzel) hastalığın vektörü olduğu rapor edilmiştir (Ciuffo vd 2010, de Borbon vd 2006, Jones 2005, Ohnishi vd 2006, Premachandra vd 2005). Bu türlerden *Frankliniella occidentalis* Pergande, *Thrips tabaci* Lindeman ve *F. schultzei* Trybomun en yaygın türler olduğu rapor edilmiştir. Amerika, Kanada, Avrupa ve Avustralya'da hastalığın yayılmasında; *F.occidentalis* in *Thrips tabaci* den daha fazla etkili olduğu (Ullman vd 1997) ortaya konulmuştur. Ülkemizde ise *Frankliniella occidentalis* ve *Thrips tabaci* nin (özellikle Ege ve Akdeniz bölgelerinde) TSWV nin yayılmasında etkili olan 2 önemli vektör olduğu belirtilmiştir (Lodos 1982, Azeri 1994, Tunç ve Göçmen 1995, Tunç 1985).

Hawaii, Mau'de 1981-1984 yılları arasında TSWV ve thrips surveyi yapılmış olup; hastalığa rastlanma sıklığı ve thrips sayısının alçak yerlerde (366 m) üretim yapılan alanlarda daha fazla olduğu belirlenmiştir. *Frankliniella occidentalis, F. Scultzei* ve *Thrips tabaci* nin hastalığın taşınmasında etkili olduğu vurgulanmıştır. *F. occidentalis* in 366 m ve 634 m de, *Thrips tabaci* nin ise 701 m de dominant olarak bulunduğu kaydedilmiştir. Kula'da 23 adet diğer thrips türlerinin varlığı tespit edilmiştir. *Neohydatothrips gracilipes, Baileyothrips limbatus* ve *Scirtothrips inermis* in Hawaii'de yeni türler olduğu belirlenmiştir. Thrips sayısı ile TSWV'nin yaygınlığı arasında bağlantı olduğu belirtilmiş olup, aylık yağış, sıcaklık, minimum ve maximum sıcaklık değerlerinde hastalığın görülmesi üzerinde etkili olduğu belirtilmiştir (Cho vd 1987).

Thripsler bitki özsuyunu emerek verdikleri doğrudan zararın yanı sıra; bitki virüs hastalıklarının taşıyıcısı olmaları ve polifag beslenmeleri nedeniyle Dünya'da önemli zararlılardan bir tanesidir. Thripslerin 1. dönem larvalarının infeksiyonlu bitkiler ile beslenmesi sonucu virüsü bünyelerine almakta ve bitkilerde infeksiyona neden olmamaktadır. Hastalığın taşınması virüsün replikasyonu ve tükrük bezlerine taşınması ile 2. dönem larva ya da Thrips erginleri ile gerçekleşmektedir (Wijkamp vd 1993).

2.2.3. Hastalığın belirtileri ve mücadelesi

TSWV ile bulaşık bitkilerde meydana gelen simptomlar bitkinin gelişme dönemi, çevresel faktörler (sıcaklık, ışık), konukçu bitki ve virüs türüne bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir (Adkins 2000). Yüksek sıcaklığın (> 30°C) TSWV infeksiyonlarını arttırdığı (Roggero vd 1999) ve bazı dayanıklı biber çeşitlerinde sistemik belirtiler oluşmasına neden olduğu belirtilmiştir (Moury vd 1998). Bitkinin bütün aksamlarında sararma ve sürgün ucunu kurutarak aniden büyümenin durması, yapraklarda kıvrılma, mozaik ya da nekrotik beneklenme, meyvede iç içe geçmiş sarı halkalar ve deformasyon (Cho vd 1989) *C. annuum*'da görülen belirtileridir.

TSWV'nin mücadelesinde, kimyasal uygulamalar sadece vektöre yönelik olabilmekte ancak; bilinçsiz ve yoğun ilaç kullanımı sonucu vektörlerin pyrethroids, carbamates, organophosphates ve abamectin içerikli insektisitlere karşı direnç geliştirmeleri (le 1970, Cho vd 1989, Rice vd 1990), meyvelerde kalıntı oluşturabilmesi, üreticilerin maliyetlerini arttırırken; çevre ve insan sağlığını olumsuz etkilemesi gibi nedenlerle etkinliği düşük bulunmaktadır. Kimyasal kontrole alternatif olabilmesi için thrips predatörleri gibi biyolojik yöntemler ya da thripslerin sera içine girmesini önleyecek ağların kullanılması (Jones 2004), UV yansıtıcı malçların uygulanması gibi farklı fiziksel yöntemler ve etkinlikleri araştırılmıştır.

Gürcistan'da 1999, 2000, 2001 ve 2002 yıllarında ilkbahar döneminde domateste thripslerin ve thripslerle taşınan TSWV'nin azaltılmasına yönelik farklı yöntemler denenmiş ve meyve verimi gözlenmiştir. *Franklinielle occidentalis* (Pergande) ve *Frankliniella fusca* (Hinds) populasyonları yapışkan tuzaklar kullanılarak tespit edilmiştir. Konukçu bitki dayanıklılığı, insektisit uygulamaları ve gümüş ya da metalik yansıtıcı malç kullanımının etkileri çalışmanın konusunu oluşturmuştur. 'BHN444' TSWV dayanıklı domates çeşidi gümüş yansıtıcı malç kullanılan sıralarda thripslerden ve TSWV'nin etkilerinden en düşük seviyede etkilenmiş olup; verim artışı gözlemlenmiştir. Toprağa 'imidacloprid' uygulamasının ardından erken dönemdeki bitki yapraklarına thripslere karşı etkili insektisit uygulaması thrips ve hastalığın kontrolünde başarılı bulunmuştur. Domates verimi ile *F. fusca* sayısı ve hastalığın görülme yüzdesi arasında ters orantılı ilişki, her çiçekteki F. *occidentalis* sayısı ile hastalığın görülme yüzdesi arasında pozitif ilişki bulunmuştur. TSWV'nin etkisinin yüksek olduğu dönemlerde (>17) erken yetiştirme sezonunda thrips kontrolü için bu yöntemlerin uygulanmasının domates verimini arttırmada etkili olduğu Riley ve Pappu (2004) tarafından bildirilmiştir. Toprağa imidacloprid uygulaması ve bitki dikiminden sonra thrips kontolü için yapraktan insektisit uygulaması ile bir sezonda %17 oranında hastalığın azaltılabildiği belirtilmiştir (Riley 2000).

Farklı plastik toprak malçlarının (siyah plastik malç, UV yansıtıcı malç), insektisit uygulamalarının ve thrips predatörlerinin kullanılması gibi farklı yöntemlerin hastalığın vektörü olan Frankliniella türlerine etkileri Reitz vd (2003) tarafından yürütülen bir çalışmada ortaya konulmuştur. UV yansıcı malçların siyah malçlara oranla erken dönemde thrips populasyonunu kontrol altına almada ve verim üzerinde daha fazla etkili olduğu, kullanılan insektisitlerin etken maddelerine göre Frankliniella populasyonlarında farklılıklar yarattığı gözlemlenmiştir. *O. insidiosus* ve *Geocoris punctipes* (Say) predatörlerinin thrips populasyonunu baskıladığı ve *O. insidiosus*

spinosad etken maddeli insektisitlerden daha az etkilendiği bildirilmiştir. Biber yetiştiriciliği yapılan alanlarda UV yansıtıcı malçlar ile bitkinin erken dönemlerinde spinosad etken maddeli insektisitlerin kullanımın thrips populasyonun azalttığı belirtilmiştir (Reitz vd 2003).

Mirabilis jalapa ve *Harpulia cupanioides* bitkilerinin antiviral etkileri tam olarak ortaya çıkarılmamış olsa da; bu bitkilerden elde edilen antiviral proteinlerin TSWV'yi azaltmadaki etkinliği araştırılmıştır. *Mirabilis jalapa* (MAP) ve *Harpulia cupanioides* (HAP) dan elde edilen proteinlerin %60-80 oranında hastalığın engellenmesinde etkili olduğu belirlenmiştir. Map'ın 400 µg/ml lık konsantrasyonun TSWV nin engellenmesi için yeterli olduğu bulunurken, HAP'ın ise 800 µg/ml dozunun lezyon oluşmasını %98.41 oranında engellediği bulunmuştur (Devi vd 2004).

Domateste UV yansıtıcı malç, 'acibenzolar S methyl' ve insektisit uygulamasının TSWV ve thrips populasyonu üzerine etkinliği Florida'da (Momol vd 2004) ve Güney İtalya'da (Fanigliulo 2009) araştırılmıştır. Hastalığın yayılımını engelleyebildiği belirtilmiştir.

Hastalığın görülme oranına bağlı olarak mevcut mücadele yöntemlerinin tek başına etkili olmadığı ve farklı mücadele yöntemlerinin birlikte kullanılarak belli oranlarda TSWV kontrolü sağlanabileceği belirtilmiştir (Riley ve Pappu 2000). Bitkilerdeki dayanıklılık genlerinin keşfedilmesi ve kültür çeşitlerine aktarılması; virüs hastalıkları ile mücadelenin yeni bir boyut kazanmasına yol açmıştır. Krizantem (Daughtrey vd 1997), marul (Cho vd 1996), domates (Stevens vd 1992) ve biber'de (Boiteux ve de Ávila 1994) TSWV'ye karşı dayanıklılık kaynakları belirlenmiş olup; domateste *Solanum peruvianum*da 'Sw-5' geninin dayanıklılık sağladığı kültür çeşitlerinden *Solanum lycopersicum*a aktarıldığı Moury vd (1998) tarafından belirtilmiştir.

Patojenin temasa geçtiği konukçu hücre ve komşu hücrelerin hızlı bir şekilde ölmesi, hücre ölümlerinden sonra nekrotik lekelerin oluşması 'Hipersensitif Reaksiyon (HR)' olarak adlandırılmaktadır (Goodman ve Novacky 1994). *Capsicum* türlerinden *C. chinense* ve *C. baccatum*'un 'PI159236', 'PI152225' (Black vd 1991), 'CNPH275' (Boiteux vd 1993), '7204' (Nuez vd 1994), 'PI15' (Jorda vd 1994) ve'C00943' (Hobbs vd 1994) genotiplerinde HR oluşturak TSWV'ye dayanıklılık sağladığı gözlemlenmiş ancak; allelizm ve progeny testlerinden sonra *C. chinese*'nin'PI152225', 'PI159236', 'CNPH275','7204' hatlarında dayanıklılık bulunduğu, dominant tek gen (*Tsw*) tarafından kontrol edildiği ve bütün hatlarda aynı lokusta yer aldığı belirlenmiş olup (Boiteux 1995, Boiteux ve De Avila 1994, Moury vd 1997); 10. kromozomun uç kısmında haritalanmıştır (Jahn vd 2000).

Farklı sıcaklık (25°C ve 30°C) ve gelişme dönemlerinin (2-4 yapraklı) *C.chinense*'nin 'PI152225' ve 'PI159236' dayanıklı genotipleri üzerine etkileri Soler vd (1998) tarafından araştırılmıştır. 30/18°C (gündüz/gece) sıcaklıklarında her iki büyüme döneminde de sistemik belirtiler gözlemlenmiştir. 25/18°C de bitki 2 yapraklı büyüme dönemindeyken sistemik belirtilerin oluştuğu ancak; 4 yapraklı dönemde herhangi bir belirti oluşmadığı ve ılıman iklim koşullarında mevcut dayanıklılık kaynaklarının infeksiyonları önleme potansiyeli daha fazla bulunmuştur.

İnokülasyon koşulları, yüksek sıcaklık ve virüs izolatına bağlı olarak, mevcut dayanıklılık kaynaklarının etkinliği düşük bulunmuş olup; İtalya (Roggero vd 1996), İspanya (Margaria vd 2004), Avustralya (Thomas-Carrol vd 2003) ve Türkiye'de (Deligöz vd 2014) *Tsw* geni taşıyan biberlerde dayanıklılığın kırıldığı rapor edilmiştir. Erken dönemde hastalığa yakalanan bitkilerde sistemik infeksiyonlar gözlemlenmiş olup; (Moury vd 1998, Soler vd 1998) yeni dayanıklılık kaynaklarının bulunması hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda farklı *Capsicum* türlerine ait 29 genotip de TSWV ile mekanik inokülasyon gerçekleştirilmiş ve beş hatta dayanıklılık farklı yüzdelerde gözlemlenmiş olup; 'ECU973' hattında en iyi TSWV dayanıklılığı elde edilmiştir. Mekanik inokülasyon sonrası elde edilen verilerin desteklenmesi için 3 farklı TSWV izolatı ayrıca thrips inokülasyonu da gerçekleştirilmiş ve %100 dayanıklılık performansı gösterdiği belirlenmiştir (Cebolla-Cornejo vd 2003).

6 Capsicum türüne ait 487 genotip ve 30 ticari F1 çeşidinde TSWV'ye yeni dayanıklılık kaynağı bulunması için yapılan bir çalışmada; *C. chinense*'nin 'AC09-207' hattı yeni dayanıklılık kaynağı olarak tanımlanmış ve dayanıklılığın tek gen tarafından sağlandığı belirlenmiştir. AC09-207 de oluşan nekrotik simptomların 'PI152225' ile benzerlik gösterdiği ancak; inoküle edilen kotiledonlar ve yapraklarda oluşan simptomların büyük oranda 'PI152225' ve 'PI159236' farklı olduğu belirlenmiştir. Yeni dayanıklılık geni ve *Tsw* geninin genomdaki lokasyonunun kıyaslanabilmesi için alleizm testleri yapılmıştır. Yeni dayanıklılık kaynağı ve mevcut dayanıklılık kaynaklarından (PI152225, PI159236 ve PI159234) oluşturulan F1, F2 ve reciprocal geri melez populasyonlarında rekombinasyon bulunmamıştır. Yeni dayanıklılık geninin *Tsw* lokusundaki tek allel ya da *Tsw*'ye bağlı (link) farklı gen tarafından kontrol edilebileceği belirtilmiştir (Hoang vd 2013).

2.3. TSWV'ye Dayanıklılığın Klasik Yöntemlerle Testlenmesi

Hastalıklara dayanıklı çeşit geliştirilmesi amacı ile yapılan ıslah çalışmalarında hassas ebeveyn ile dayanıklı ebeveynin melezlenmeleri sonucu elde edilen dayanıklı bireylerin belirlenmesi en büyük zorluğu oluşturmaktadır (Devran 2003).

Bu amaç doğrultusunda klasik ve moleküler testleme yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Klasik testleme yöntemi; mekanik inokülasyon (hastalık etmeninin bitkiye bulaştırılması) ya da vektör inokülasyonu (tarla koşullarında thripslerin bitkilerde doğal infeksiyon oluşturmaları) şeklinde gerçekleştirilmektedir.

İnokülasyon sonrası bitkilerde gözlem yapılarak ya da serolojik testlerden yararlanılarak (Stevens vd 1992, Boiteux ve de Ávila 1994) dayanıklı ve hassas genotipler belirlenebilmektedir.

2.4. TSWV'ye Dayanıklılığın Moleküler Yöntemlerle Testlenmesi

Günümüz koşullarında üretim sahası ve zamanına bağlı olarak en az üç veya daha fazla hastalık ve zararlı etmene karşı dayanıklılığa ihtiyaç duyulmaktadır. İhtiyaç duyulan dayanıklılık sayısı artıkça, ıslah süresi uzamakta (Pınar vd 2013) ve klasik yöntemlerle; bir bitkinin aynı anda birden fazla patojenle testlenmesi imkânsızlaşmaktadır (Moury vd 2000). TSWV birçok Avrupa ülkesinde karantina altına alınan patojenler arasındadır, bu yüzden vektörün üretimi, ya da inokulumun hazırlanması sırasında kontrollü şartlarda çalışılması ve bulaşmaların önlenmesi gerekmektedir. TSWV'nin mekanik inokülasyon ile destabilize olduğu (de Resende vd 1991; Moury vd 1997) ve bunun inokulumun homojenitesinin sürdürülmesinde engel oluşturduğu belirtilmiştir. Yüksek sıcaklığın dayanıklılığın bozulmasına neden olması (Roggero vd 1996, Moury vd 1998, Soler vd 1998) testlenecek ortamda sıcaklığın kontrol edilmesini gerektirmektedir. Klasik yöntemlerle dayanıklılık testlemesi yapılacak bitki sayısının fazla olduğu durumlarda daha geniş testleme alanına ihtiyaç duyulması ve beraberinde daha fazla işgücü gerektirmesi, gerek indikatör bitkilerin yetişmesi için gerekse inokülasyondan sonra bitkilerden sonuç alıncaya kadar geçen sürenin uzun olması nedeni ile TSWV'ye dayanıklılığın moleküler testlenmesi klasik testlenmesine iyi bir alternatif oluşturmaktadır.

TSWV'nin biberdeki mevcut moleküler testlemesi Moury vd (2000) tarafından geliştirilmiştir. 250 adet 10 bp uzunluğunda farklı RAPD primerleri F2 ('PI 195301' × 'PI 152225') kademesindeki 153 adet bitkide BSA yöntemi ile taranmıştır ve bu primerlerden dört (OPAC10, OPAH13,OPAF16, OPB01) tanesinin *Tsw* lokusu ile bağlantılı olduğunu bulmuşlardır. OPB01750 ve OPAC10593 RAPD markırlarının CAPS markırına dönüştürülmesi için iyi birer aday olduğu belirtilmiş ancak; OPB01750 RAPD markırından geliştirilen SCAR markırının 25 farklı restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucu bireylerde polimorfizm elde edilememiştir. OPAC10593 RAPD markırının klonlanması ve DNA dizisinin belirlenmesinden sonra; DNA dizisi kullanılarak SCAR primeri sentezlenmiş (SCAC568) ve bu primer ile PCR amplifikasyonunda 568 bp büyüklüğünde tek bant elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Dominant SCAR markırın kodominant markıra çevrilmesi amacıyla 2 dayanıklı genotip (PI152225 ve PI152236) ve 7 farklı hattan izole edilen DNA'lardan SCAC568 primeri ile PCR amplifikasyonu yapılarak, elde edilen 568 bp büyüklüğündeki bant XbaI restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Dayanıklı genotiplerde SCAR markırın restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucu 74 bp ve 494 bp büyüklüğünde 2 DNA bandı elde edilirken; diğer 7 genotipde enzim kesim bölgesininin olmadığı belirlenmiştir. F2 kademesindeki 139 adet genotip ile yapılan analizler sonrasında kodominant CAPS

markırının (SCAC568 + *Xba*I) *OPAC10593* RAPD markırı ile ko-segregasyon gösterdiğinin belirlenmesi ile aynı lokusta bulundukları ortaya konulmuş ve markırın gene uzaklığının 0.87 cM olduğu belirlenmiştir. XbaI restriksiyon enzimi dışında TaqI ve HaeIII enzimleri ile dayanıklı genotipler (PI152225ve PI152236) ve 5 *Capsicum annuum* hattı arasında polimorfizm elde edilmiş ve bu polimorfizmin *C. annuum*'un *Tsw* geni aktarılan çeşitlerinde genetik temellerin anlaşılması için kullanışlı olabileceği belirtilmiştir. *C. chinense*'nin '7204' dayanıklı hattında geliştirilen bu CAPS markırı ile *C. annuum*'un hassas hatları arasında polimorfizm elde edilememiştir. SCAR amplifikasyonunun XbaI, TaqI ve HaeIII restriksiyon enzimlerinden biri ile kesilmesi sonucu 'PI152225' ve 'PI159236' ve testlenen *C. annuum* hatları arasında eşit polimorfizm oranları elde edilirken; '7204' ve 'PI195301' hatlarının XbaI enzimi ile kesilmesine ilaveten TaqI ya da HaeIII enzimi ile kesilmesinin gerekliliği belirtilmiştir.

2.5. Biber Çalışmalarında Kullanılan Moleküler Markırlar

Capsicum türlerinde; tür içi ve türler arası genetik çeşitlilik analizleri, DNA parmak izlerinin çıkarılması, tohum saflık analizleri, filogenetik akrabalıklar, genomik kütüphanelerin oluşturulması, bağlantı (linkage) analizleri ve ilgilenilen genlerin (acılık, hastalıklara dayanıklılık vb.) haritalanması gibi birçok alanda moleküler markırlardan yararlanılmaktadır. Moleküler markırların çevresel faktörlerden etkilenmemeleri, çekirdek ve farklı kalıtım şekline sahip kloroplast ve mitokondri gibi organel genomlarının ayrı ayrı çalışılmasına olanak sağlaması, sayılarının çok fazla olması, genetik değişiklikleri daha fazla yansıtmaları (Gülşen ve Mutlu 2005) gibi avantajlarından dolayı yoğun olarak kullanılmaktadır.

Tanksley (1984) tarafından biberde enzim kodlayan genlerin linkage haritasının oluşturulması amaçlanmıştır. Türler arası melezleme (*C. annuum* X *C. chinense*) ile 9 adet izoenzim markırı kullanarak linkage haritası oluşturmuştur. Linkage haritası ile *Solanaceae* familyası içindeki diğer cinslerin ortolog gen bölgelerinin kıyaslanması ve koromozomlarda meydana gelen değişimlerin belirlenmesi hedeflenmiştir. *C. annuum*'da gen duplikasyonlarının varlığı bu çalışma ile ortaya konulmuştur (Tanksley 1984).

RFLP' nin izoenzimlere oranla *C. annuum* türlerinde daha fazla polimorfizm belirlenmesine olanak sağladığı; genetik çeşitlilik, haritalama çalışmaları için daha uygun olduğu Lefebvre vd (1993) tarafından belirtilmiştir. Kodominat özellik göstermesine karşılık; radyoaktif işaretli probların kullanılması, fazla işgücü gerektirmesi ve pahalı olması tekniğin uygulamasına sınırlamalar getirmektedir (Tanksley 1989).

Domates ve biberdeki genetik benzerlik ve farklılıkların ortaya koyulması amacı ile Tanksley vd (1988) tarafından biberde ilk RFLP temelli bağlantı haritası oluşturulmuştur. Domates yapraklarından izole edilen RNA ve biber yapraklarından izole edilen mRNA dan cDNA probları sentezlenmiştir. *C. annuum* ve *C. chinense*' nin

melezlenmesi ile elde edilen F_1 lerin *C. annuum* ile geri melezlenmesi sonucu 46 adet bitki haritalamada kullanılmıştır. 80 tane RFLP markırı kullanılarak 14 adet linkage grubu oluşturulmuştur. Domates ve biberin aynı genleri içerdiği ancak; biberde linkage gruplarının üzerindeki genlerin sırasının, domatestekinden çok farklı olduğu belirlenmiştir. Karşılaştırmalı haritalama ile domates kromozomunda en az 32 adet kırılmanın meydana geldiği ve biber genomundaki ortolog genlerin pozisyonlarının açıklanabileceği belirtilmiştir (Tanksley vd 1988).

Mullis vd (1986) tarafından Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PCR) keşfedilmesi, PCR temelli marker sistemlerinin (RAPD, AFLP, SSR, SRAP, ISSR vb.) kullanımının önünü açmıştır. PCR kaynaklı polimorfizmin sebebi, kromozom düzeyinde meydana gelen yerleştirme/iptal ve mutasyon nedeniyle oluşan primer yapışma bölgesi kazancı/kaybı olabileceği belirtilmiştir (Gülşen ve Mutlu 2005).

Biberde hibrit tohum saflığı ve çeşit tanımlamada RAPD markırlarının potansiyelinin değerlendirilmesi için yapılan çalışmada; 5 jalopeno F_1 hibrit çeşidi ve ebeveylerinin 10 bazlık 12 RAPD primeri ile analizi yapılmıştır. 10 RAPD primerinden toplam 177 tekrarlanabilir bant elde edilmiş olup; bantların büyüklüğü 300 ile 1600 bp arasında değiştiği, bir primerden ortalama 17 bant elde edildiği ve RAPD markırlarının özellikle rutin tohum kalite analizlerinde kullanılabileceği vurgulanmıştır (İlbi 2002).

Capsicum'un diğer türlerine oranla *Capsicum annuum* L. nin özellikle meyve şekli yönününden geniş varyasyon gösterdiği ancak; ticari çeşitlerde özellikle F_1 hibrit biberlerinde genetik varyasyonun az ve çeşitlerin birbirinden ayrılmasının zor olduğu vurgulanmaktadır. İlk olarak bitkinin farklı büyüme dönemlerindeki morfolojik özelliklerinden yararlanılarak (Sithiwong vd 2005), daha sonraki çalışmalarda izoenzimler, kromozom morfolojisi (Pickersgill 1971) gibi yöntemler kullanılmıştır. RFLP (Lefebvre 1993), AFLP, RAPD (Paran 1998) markır sistemlerinin genetik çeşitlilik çalışmalarında kullanılabilirliği vurgulansa da; RAPD analizlerinde radyo aktif işaretli problara ve primer sentezi için DNA sekansı bilgisine ihtiyaç duyulmaması, kolay, işgücü gerektirmemesi, az miktarda DNA (5-50ng) ile çalışılabilirliği nedeni ile diğer markır sistemlerine göre avantajlı bulunmaktadır.

Tekrarlanabilirliğinin ve markır spesifikliğinin düşük olması nedeni ile RAPD ve ISSR markırlarının hassasiyetinin arttırılması için; bu yöntemlerden elde edilen bantların jel üzerinden kesilerek 3´ sonlarındaki DNA dizisinin tespiti ve daha uzun dolayısı ile spesifik primerler olarak PCR reaksiyonlarında kullanılması (SCAR markırlarına dönüştürülmesi) ile güvenilirliğinin arttırılabileceği belirtilmiştir (Yu vd 2000, Paran ve Michelmore 1993). SCAR markırları genellikle dominant olduklarından, restriksiyon enzimleri ile kesilerek kodominant markırlara dönüştürülebilmektedir (Konieczyn ve Ausubel 1993). Biber dışında domateste de çeşitli hastalık ve zaralılara karşı dayanıklılık için SCAR ve CAPS markörleri geliştirilmiş olup; ıslah programlarında yoğun bir şekilde kullanıldığı belirtilmiştir. (Barone 2004).

Yabani biber hattı 'SCM334' de dominant *'Pvr4'* geninin patates Y virüsünün (PVY) üç ırkına (0, 1, 1-2), PepMoV karşı dayanıklılık sağladığı (Pasko vd 1992) ve bu genin marker destekli seleksiyon (MAS) programlarında kullanılması amacı ile gen ile bağlantılı AFLP markırları bulk segregasyon analizi (BSA) yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Bu lokustaki 8 AFLP markırı haritalanmıştır ve gene en yakın markır kodominant CAPS markırına dönüştürülerek; farklı biber hatlarında markır destekli seleksiyon çalışmalarında kullanılabileceği belirtilmiştir (Caranta vd 1999). Arnedo-Andres vd (2002), '*Pvr4'* lokusu ile bağlantılı SCAR ve RAPD markırları geliştirmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada ise; *C. chinense'*nin 'PI159236' hattında bulunan dominant '*Pvr7'* geninin PepMoV'ye karşı dayanıklılık sağladığı belirlenmiş olup; *Pvr4* geni ile bağlantılı CAPS markırı oluşturulmuştur. Biberde dominant dayanıklılık genlerinden *Tsw- Pvr4- Pvr7* nin küme halinde bulunduğu ilk defa bu çalışma ile ortaya konulmuştur ve 10. kromozomun uç kısımda haritalanmıştır (Grube vd 2000).

Biberde acılığın kapsaisin molekülü tarafından sağlandığı ve biyosentezi *Pun1* lokusuna yerleşmiş olan açiltransferaz enziminin kodladığı varsayılan AT3 genine bağlı olarak gerçekleşmektedir (Şener vd 2010). Kapsaisinoid bileşiklerinin sadece *Capsicum* cinslerinde bulunduğu ve genotiplerin kapsaisin miktarının düşük sıcaklık ve ışık yoğunluğunda düşük olduğu, çevre koşullarından etkilendiği (Murakami vd 2006) rapor edilmiştir. Markır destekli seleksiyon (MAS) programlarında kullanılabilmesi için bu lokusla bağlantılı moleküler markır geliştirilmesi amacı ile birçok çalışma yapılmıştır (Truong vd 2009). Blum vd (2002), *Pun1* den 0.4 cM uzaklıkta bulunan 'fibrillin geni'nin DNA sekansını kullanarak CAPS markırı geliştirmişlerdir ve bu markırın kullanılan populasyona göre, *Pun1* lokusuna 3.6 ya da 12.2 cM uzaklıkta olduğunu, MAS' da kullanılabilmesi için markırın uzak olduğu Minamiyama (2005) tarafından belirtilmiştir.

3. MATERYAL ve METOT

Araştırmanın, laboratuar çalışmaları Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji ana bilim dalında, arazi çalışmaları ise Sürde Tarım-Proto Tohum LTŞ'de 2012-2015 yılları arasında yürütülmüştür. TSWV'ye dayanıklı çeşit geliştirilmesi için yapılan ıslah çalışmalarında kullanılan mevcut moleküler testlemenin dezavantajlarının giderilmesi amacı ile *Tsw* genine bağlı moleküler markır(lar)ın geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Çalışma birbirini takip eden üç kısımdan oluşmaktadır.

1. Örtü altı biber yetiştiriciliği yapılan ve patojenin baskısı altında kalan bitkilerin gözlemlenmesi ve simptomların varlığı-yokluğuna göre değerlendirilerek TSWV'ye dayanımlarının fiziksel olarak belirlenmesi. Bu bitkilerden yaprak örneklerinin alınması ve DNA izolasyonu yapılarak mevcut testleme yöntemi ile TSWV'ye dayanımlarının moleküler olarak belirlenmesi,
2. SCAR (SCAC568)-SRAP kombinasyonları kullanılarak, hassas ve dayanıklı bitkilerden oluşturulan bulk DNA'lar ile PCR kurulması ve polimorfik bulunan kombinasyonların tüm bireylerde taranması,
3. Biber için geliştirilmiş SSR primerlerini kullanarak; hassas ve dayanıklı bulklar ile PCR amplifikasyonunun yapılması ve polimorfik olan primerlerin tüm bireylerde taranması.

3.1. Materyal

Çalışma materyali Sürde Tarım-Proto Tohum LTŞ'den temin edilmiştir. Değişik meyve tipleri ve farklı genetik altyapıya sahip F4 kademesindeki biber ıslah materyallerinin arazi koşullarında TSWV'ye dayanımları fiziksel olarak gözlemlenerek 96 tanesi seçilmiştir ve yeni markır(lar)ın geliştirilmesi için yapılan çalışmalarda kullanılmıştır. Elde edilen markırın güvenilirliğinin testlenmesi amacı ile farklı genetik altyapıya sahip 381 adet biber genotipinde taraması gerçekleştirilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. TSWV'nin saha şartlarında gözlemlenmesi ve hastalığa dayanıklılığın skorlanması

Örtü altı biber yetiştiriciliği yapılan ve patojenin doğal baskısı altında kalan F4 kademesindeki ıslah materyallerin gözlemlenerek ve simptomların varlığı-yokluğu değerlendirilerek çalışma materyallerinin TSWV'ye dayanımları fiziksel olarak belirlenmiştir.

3.2.2. DNA izolasyonu

Arazi koşullarında TSWV'ye dayanımları fiziksel olarak gözlemlenmiş bitkilerin her birinden genç yaprak örnekleri alınarak DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA izolasyonu 'Promega' firmasının 'Wizard Genomic DNA Purification Kit'i' kullanılarak ve üretici firmanın protokolü uygulanarak 400 mg yaş yapraktan gerçekleştirilmiştir.

DNA izolasyonu yapılan örneklerin kontrolü için herbir genotipten elde edilen 2 µl hacminde DNA 1 µl yükleme boyası (bromophenol blue) ile karıştırılarak % 1'lik agaroz (Sigma) jele yüklenmiştir. Elektroforez cihazında 65 voltta 15 dakika yürütülen örnekler UV transilluminatör cihazı ile görüntülenmiştir. Elde edilen stok DNA'lar ihtiyaç olduğunda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

3.2.3. Moleküler testleme yöntemi ile genotiplerin TSWV'ye dayanımlarının belirlenmesi

Biberde TSWV'ye karşı dayanıklılığı sağlayan *Tsw* geninin çalışma materyallerinde moleküler olarak tespiti CAPS markırı ile yapılmıştır (Moury vd 2000) ve bu metodun basamakları maddeler halinde aşağıda özetlenmiştir (İkten vd 2010).

1. SCAC 568 primeri kullanılarak ilgili gen bölgesinin çoğaltılması
2. Elde edilen PCR ürünlerinin 2 ayrı restriksiyon enzimi (Xba ve TaqI) kullanılarak kesilmesi
3. Kesim sonrası ürünlerin %1,5 luk agarose jelde yürütülmesi
4. Elde edilen bantların görüntüsüne göre RR, Rr, rr bitkilerin belirlenmesi.

Çizelge 3.1. SCAC568 ileri ve geri primerlerinin nükleotit dizilimi

Primerin adı	**Primerlerin nükleoit dizilimi**
SCAC568- F (ileri primer)	GTGCCAGAGGAGGATTTAT
SCAC568-R (geri primer)	GCGAGGTGGACACTGATACT

SCAC568 primeri ile PCR amplifikasyonundan sonra iki ayrı kesim enzimi ile ürünler kesileceği için; örnek başına toplam 30 µl hacimde tepkime karışımında kullanılan miktarlar ve PCR döngüsü Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. PCR tepkime karışımında kullanılan miktarlar ve PCR döngüsü

H2O	**Buffer (10X)**	**MgCl2 (25mM)**	**dNTP (10mM)**	**Primer (10pmol)**	**Taq DNA Polimeraz (5 U/ µl)**	**DNA (20 ng)**
12,8µl	3µl	3µl	3µl	1(F) µl 1(R) µl	0,16µl	6µl
PCR döngüsü						
(2dak 20sn 95°C), 35X [(1dak 95°C)(59sn 53°C)(59sn 72°C)], (10dak 72°C)						

PCR amplifikasyonu sonunda beklenen ürünün elde edilip edilmediğinin kontrol edilmesi için bir stripdeki her bir örnekten 5'er µl alınarak, 3µl loading dye ile boyanmış ve %1,5 luk agarose jelde yürütülmüştür. Agarose jele 1µl 1kb DNA leadder (Thermo Scientific GeneRuler) kontrol olarak yüklenerek 100V da 30 dak. yürütülmüştür. DNR bio-imaging systems-Mini Lumi marka UV görüntüleme cihazında fotoğrafları çekilerek, bilgisayar ortamına kaydedilmiştir.

568 bp büyüklüğünde tek bandın varlığı görüldükten sonra; PCR ürünleri iki ayrı restriksiyon enzimi (Thermo Scientific) kullanılarak kesilmiştir. Kesim için kullanılan protokol, inkübasyon süresi ve sıcaklıkları Çizelge 3.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. SCAC568 primeri ile elde edilen PCR ürünlerinin kesimi

PCR ürünü	**Xba Enzim (Konsantrasyon)**	**Xba Buffer**	**H2O**	**İnkübasyon süresi ve sıcaklığı**
7 µl	1µl	1µl	9µl	2sa, 37°C
PCR ürünü	**TaqI Enzim (Konsantrasyon)**	**TaqI Buffer**	**H2O**	**İnkübasyon süresi ve sıcaklığı**
7 µl	1µl	1µl	9µl	2sa, 65°C

İnkübasyon süresi sonunda kesim ürünlerine 3 µl yükleme boyası eklenerek %1,5 luk agarose jelde, 1X lik TBE buffer yardımı ile 100V da 1 saat yürütülmüştür ve süre sonunda görüntüleme cihazında fotoğrafları çekilerek, bilgisayar ortamına kaydedilmiştir.

%1,5 luk agaroz jelin hazırlanması: Erlen mayer içine 100 ml 1X lik TBE tampon çözeltisi konulmuş, çözeltinin içine 1,5 gr agaroz (Sigma) tartılarak eklenmiş ve homojen bir karışım elde edilebilmesi için karıştırılmıştır. Ortalama 3 dakika mikrodalgada ısıtılarak agarozun tampon çözeltide çözünmesi sağlanmıştır.

Soğuması beklenen jelin içine UV altında bantların görünmesini sağlayan Ethidium Bromide (3µl) eklenerek örnek sayısına yetecek kadar tarak konulmuş jel kabına dökülmüştür. Jel tamamen soğuduktan sonra kuyucuklara zarar vermemek için taraklar yavaşca çıkarılmıştır ve elektroforez tankının içine, jelin üst kısmını kapatacak kadar 1X lik TBE tampon çözeltisi dökülmüştür.

1X lik TBE tampon çözeltisi hazırlanışı: Elektroforezde tampon çözelti olarak Tris-Borik asit-EDTA (54 g/L tris, 27,5 g/L borik asit, 40 ml 0,5 M EDTA) kullanılmıştır. Bu çözelti pH:8.0 olacak şekilde 10X yoğunluğunda hazırlanarak 1lt saf suda çözdürülmüştür. 10X lik stok çözeltiye 9 lt saf su eklenerek 1X e seyreltilmiştir.

3.2.4. Bulk segregasyon analizi (BSA)

Çalışma materyallerinin fiziksel gözlemler ve mevcut moleküler testleme yöntemi ile TSWV'ye dayanımları belirlendikten sonra; Michelmore vd (1991) tarafından geliştirilen bulk segregasyon analizi yöntemi temel alınarak dayanıklı (10 birey) ve hassas (10 birey) DNA bulkları oluşturulmuştur. DNA bulklarının oluşturulması için seçilen dayanıklı ve hassas birey DNA'larından 10 ar µl alınarak iki farklı eppendorf tüp içerisinde karıştırılmıştır. Hassas ve dayanıklı DNA bulklarının dışında fiziksel gözlemler ve moleküler testleme sonuçları farklılık gösteren genotipler kullanılarak dört farklı DNA havuzu daha oluşturulmuştur. Çalışmada kullanılan SRAP ve SSR markır sistemleri için belirtilen bu DNA bulkları kullanılmış olup; Çizelge 3.4' de oluşturulan DNA bulkları gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. SRAP ve SSR markır sistemlerinde kullanılan DNA bulkları

Bulk adı	Fiziksel gözlem sonucu	SCAC568 primeri ile elde edilen moleküler testleme sonucu
B1	Dayanıklı (RR/Rr)	RR
B2	R.	Rr
B3	R.	rr
B4	rr	RR
B5	rr	Rr
B6	Hassas (rr)	rr

3.2.5. SCAC568 X SRAP kombinasyonları ile PCR amplifikasyonu

Çizelge 3.5'de belirtilen SRAP primerleri ile *Tsw* genine bağlı olan SCAC568 primeri (Moury vd 2000) eşleştirilerek PCR amplifikasyonu yapılmıştır. Bu primerler ile öncelikli olarak hassas ve dayanıklı DNA bulkları arasındaki polimorfizm incelenmiş ve elde edilen polimorfizm F4 kademesindeki bireylerde analiz edilmiştir. Çalışmada SCAC568 forward ve SCAC568 reverse primerleri, 16 adet Em primeri ve 13 adet Me primeri ile kullanılarak toplam 58 kombinasyon oluşturulmuştur.

Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan SRAP primerleri nükleotit dizilimi (Ruiz vd 2005)

Reverse primer 5'→3'		**Forward primer 5'→3'**	
Me1	TGA GTC CAA ACC GGA TA	**Em1**	GAC TGC GTA CGA ATT AAT
Me2	TGA GTC CAA ACC GGA GC	**Em2**	GAC TGC GTA CGA ATT TGC
Me3	TGA GTC CAA ACC GGA AT	**Em3**	GAC TGC GTA CGA ATT GAC
Me4	TGA GTC CAA ACC GGA CC'	**Em4**	GAC TGC GTA CGA ATT TGA
Me5	TGA GTC CAA ACC GGA AG	**Em5**	GAC TGC GTA CGA ATT AAC
Me6	TGA GTC CAA ACC GGA CA	**Em6**	GAC TGC GTA CGA ATT GCA
Me7	TGA GTC CAA ACC GGA CG	**Em7**	GAC TGC GTA CGA ATT CAA
Me8	TGA GTC CAA ACC GGA CT	**Em8**	GAC TGC GTA CGA ATT CAC
Me9	TGA GTC CAA ACC GGA GG	**Em9**	GAC TGC GTA CGA ATT CAG
Me10	TGA GTC CAA ACC GGA AA	**Em10**	GAC TGC GTA CGA ATT CAT
Me11	TGA GTC CAA ACC GGA AC	**Em11**	GAC TGC GTA CGA ATT CTA
Me12	TGA GTC CAA ACC GGA GA	**Em12**	GAC TGC GTA CGA ATT CTC
Me13	TGA GTC CAA ACC GGA AG	**Em13**	GAC TGC GTA CGA ATT CTG
		Em14	GAC TGC GTA CGA ATT CTT
		Em15	GAC TGC GTA CGA ATT GAT
		Em16	GAC TGC GTA CGA ATT GTC

SRAP-SCAC568 kombinasyonu için kullanılan PCR tepkime karışımı toplam 15 µl reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir. PCR tepkime karışımı miktarları ve PCR döngüsü Çizelge 3.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. SRAP-SCAC568 kombinasyonları için PCR tepkime karışımında kullanılan miktarlar ve PCR döngüsü

H2O	**Buffer (10X)**	**MgCl2 (25mM)**	**dNTP (10mM)**	**Primer (10pmol)**	**Taq DNA Polimeraz (5 U/ µl)**	**DNA**
4µl	1,5µl	2µl	1µl	2µl(F) 2µl(R)	0,15µl	2,5µl
PCR döngüsü						
(5dak 94 ^{0}C), 5 X [(1dak 94 ^{0}C) (1dak 35 ^{0}C) (1dak 72 ^{0}C), 35 X [(1dak 94 ^{0}C) (1dak 50^{0}C) (5dak 72^{0}C)]						

Ürün amplifikasyonunu takiben 15 µl PCR ürününe 2 µl yükleme solusyonu eklenerek toplamda 17 µl'lik PCR ürün+yükleme boyası karışımı ethidium bromide (10 mg/ml) ile boyanmış % 3 lük agaroz jelde 1X TBE buffer yardımı ile 100 V'da 3 sa yürütülmüştür. Elde edilen bantların molekül ağırlıklarının belirlenmesinde marker olarak GeneRuler 100 bp ve 250 bp kullanılmıştır ve UV görüntüleme cihazında fotoğrafları çekilerek, bilgisayar ortamına kaydedilmiştir.

3.2.6 Simple sequence repeat (SSR) primerleri ile PCR amplifikasyonu

Biber için geliştirilmiş (Lee vd 2004, Yi vd 2006, Minamiyama vd 2006, 2007, Nagy vd 2007, Mimura vd 2010) 29 adet SSR primeri kullanılmıştır. Primerler ile öncelikli olarak hassas ve dayanıklı DNA havuzları arasındaki polimorfizm incelenmiştir. DNA havuzlarında elde edilen polimorfizmin bireyler ile tutarlılığının belirlenmesi için 96 adet F4 bireyinde analizi yapılarak *Tsw* geni ile ilişkisi araştırılmıştır. Kullanılan primerlerin nükleotit dizilimi Çizelge 3.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. Kullanılan SSR primerlerinin nükleotit dizilimi

Primer Adı	**Forward (5'-3')**	**Reverse (5'-3')**
CAeMS009	ACGCACCAACGAATATCTATCTCA	GTTTCCGTCCAGATCTACTTTTCCTGC
CaES0089	GCCTCTGTATAACAATTCAACGG	ATCGATGGAGAATGGAGTGC
CaES2666	CGACATGCTTCGTTCTTTCA	TTCGCGTCGATCTGTAAGTG
CaES2865	TTATCCCTGGCAGAGACCAC	TACCGATCTGAGTGTCGTGC
CaES4597	CACGAGGCTTGTCTTTCACA	GGGAACAAGGGTAGGGGTAA
CAMS-020	CAGCAGTAACAGAGGCAGGTC	CACAAGTGAGTTTATTCATATCACCA
CAMS-101	TCAGCAATTAACATGCCAAAA	TGGATTGGGAGAAGATCGAC
CAMS-153	TGCACAAATATGAATCCCAAGA	AAGTCAGCAAACACATCTGACAA
CAMS-162	GGACCGTTCAGGAGGTTACA	GCCATCATTCAAAACCGAAT
CAMS-311	GGTGCGCTAGAGATGGAGAG	TTTGAGTGTTCGGGACTGGT
CAMS319	TCACCTTCCACAGCATCAAG	CAAACGCAAACACCAATCAG
CAMS-327	GCATCTAAGTCTACGCCCTTG	AAAGCCTTTGGCAATGAACA
CAMS-668-2	ATCGTCCATTTGTGGGAAAA	TGTGGTCGGAAATAGGAAGAA
CAMS-838	CCAGGATGGTGTTAAGGGTTT	GTCGCATCAATGAGCATAGG
CAMS-864	CTGTTGTGGAAGAAGAGGACA	GCTTCTTTTTCAACCTCCTCCT
CAMS871	ACAAAGCATCGGCTGAAAAT	GCGACCAAGTACCAACAGGT
Hpms 1-1	TCAACCCAATATTAAGGTCACTTCC	CCAGGCGGGGATTGTAGATG
Hpms 1-117	AAGCTTATCCCTTTCAAATATAA	ATATCTCACGTATTGCGGATTCTT
Hpms 1-148	GGCGGAGAAGAACTAGACGATTAGC	CCACCCAATCCACATAGACG
Hpms 2-13	TCACCTCATAAGGGCTTATCAATC	TCCTTAACCTTACGAAACCTTGG
HpmsE031	CCCTAAATCAACCCCAAATTCAA	CCCCCATTACCTGACTGCAAAA
HpmsE059	GCAAGGACGCAGTCGTTAGACA	CCGCCTGTGCTGAATTGTTTAG
HpmsE065	TGAAATAGGCCAATCCCTTTGC	ATTCCCTGGGATTCCTGCATTA
HpmsE096	CGGGTCAAACAAAAACCGAAGT	GCTTGTGGTTGAGCTCGCTCTT
Hpms 2-21	TTTTTCAATTGATGCATGACCGATA	CATGTCATTTTGTCATTGATTTGG
Gpms 159	AAGAACATGAGGAACTTTAACCATG	TTCACCCTTCTCCGACTCC
CAMS- 336	GGTGGAAACTTGCTTGGAGA	CCCAGAACCATCCACCTACT
ge241-820pms0561W	GGGAAATCATCAGTAATACTGAGAG	GGTGGAAACTTGCTTGGAGATTG
ge70-390pmA0168C	ACCAGAGCACCCCAAAAATATACA	GTTTGTTTGGGAAATGAGTGGAAT

Daha önceki çalışmalarda uygulanmış olan PCR protokolleri bu çalışmada optimize edilerek en iyi sonucu veren solüsyon miktar, oran ve PCR döngüsü belirlenmiştir (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. SSR için PCR tepkime karışımında kullanılan miktarlar ve PCR döngüsü

H2O	**Buffer (10X)**	**MgCl2 (25mM)**	**dNTP (10mM)**	**Primer (10pmol)**	**Taq DNA Polimeraz (5 U/ µl)**	**DNA**
7µl	1,5µl	1,5µl	1µl	1µl(F) 1µl(R)	0,08µl	2µl
PCR döngüsü						
(3dak 94^0C), 35X[(30sn 94°C), (30sn 53-57^0C), (60sn 72^0C)], (5dak 72^0C)						

Toplam 15 µl hacimde hazırlanan PCR ürünlerinden 6 µl si 2 µl yükleme solüsyonu karıştırılarak toplamda 8 µl'lik PCR ürün+yükleme solüsyonu karışımı ethidium bromide (10 mg/ml) ile boyanmış ve %3 lük standart agarozda (Sigma), 1X lik TBE buffer kullanılarak 120 V'da 6 saat yürütülmüştür. Jel DNR bio-imaging systems-Mini Lumi marka UV görüntüleme cihazında fotoğraflanmıştır. PCR ürünlerinin geri kalan bölümü +4 °C de saklanarak Fragment Analyzer™ ile yapılan analiz işlemlerinde değerlendirilmiştir.

Fragment Analyzer™ (Advanced Analytical Technologies GmbH, Heidelberg, Germany) Advanced Analytical firması tarafından geliştirilen otomatik kapiller elektroforez sistemidir. Cihaz sayesinde PCR ürünleri agaroz jele gerek kalmadan yüksek hassasiyet ve çözünürlükte hem sanal jel ortamında hem de kromatogramlarla değerlendirilebilmektedir (Yol 2015).

Polimorfik olduğu belirlenen ve SCAC568 markırından elde edilen moleküler sonuçlar ile paralellik gösterdiği belirlenen SSR primerinin PCR ürünleri hem agaroz jel elektroforezi hem de Fragment Analyzer™ sistemine üretici firmanın protokolü takip edilerek yüklenmiştir.

Cihazda analizlerin yürütülebilmesi için DNF-900-K0500 kodlu kit içerisinde yer alan kimyasallar kullanılmış olup; Fragment Analyzer™ sistemi için örneklerin hazırlanması aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

1. Kapiller sistem üzerinde tampon görevi gören Inlet Buffer (930 dsDNA Inlet Buffer) 1X olacak şekilde hazırlanarak; Fisherbrand® marka 96'lık plakaya her bir kuyucuğa 1000 µl olacak şekilde aktarılmıştır ve cihazın en üst bölmesine yerleştirilmiştir.

2. Cihazın ikinci bölmesinde yer alan analiz atıklarının biriktirildiği kutu temizlenerek analiz için hazır hale getirilmiştir.

3. Cihazdaki üçüncü bölmeye ise markır plaka konularak; alt (lower) markır 35bp, üst (upper) markır ise 500bp olarak belirlenmiştir.

4. +4 °C'deki PCR ürünlerinden 2 µl alınarak 96'lık plakalara aktarılan örneklerin üzerlerine 25 µl dilution buffer eklenerek santrifüj yapıldıktan sonra cihazın dördüncü bölmesine yerleştirilmiştir.

5. Cihazın yan kısmında bulunan ve bağlantı bölgesinde "COND" yazan büyük tüpe 200 ml 1X Capillary Conditioning Solution eklenmiştir. Hacmi 50 ml olan küçük tüpe ise üretici firma tarafından hazırlanan 15 µl Intercalating Dye bulunan 50 ml jel konulmuştur.

6. Bütün bu hazırlıkların tamamlanmasının ardından bilgisayarda bulunan PROSize 2.0 (Version 1.2.1.1) (Advanced Analytical Technologies, AMES, IA, USA) yazılımı açılarak analiz başlatılarak analiz sonrası elde edilen sonuçlar görüntülenmiş ve değerlendirilmiştir.

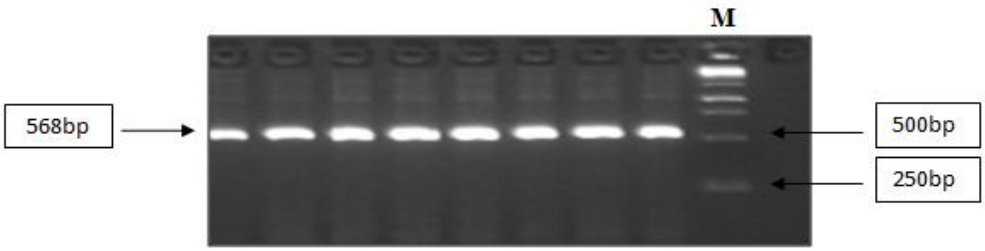
4. BULGULAR

4.1. Arazi Koşullarında Yapılan Fiziksel Gözlem Sonuçları

Sürde Tarım-Proto Tohum'un Şubat 2015 tarihinde diktiği F4 kademesindeki biber ıslah materyallerinde, gerekli rutin kontrollerin yapılmasına rağmen; Haziran ayı başlangıcında TSWV simptomları gözlemlenmiştir. Sera içerisinde yetiştirilen biber bitkilerinde hastalık simptomları olarak, hassas bitkilerin üst yapraklarında sararma, kıvrılma ve beraberinde yaprak deformasyonlarının yanı sıra bitki boyunda cüceleşme gözlemlenmiştir. Hastalık simptomlarının varlığı-yokluğuna göre değerlendirmeler yapılarak; seçilen 96 genotipden 27 tanesinin TSWV'ye dayanıklı (R.) ve 69 tanesinin ise TSWV'ye hassas (rr) olduğu belirlenmiştir. Çizelge 4.1' de fiziksel gözlem sonuçları ve SCAC568 primeri kullanılarak moleküler testleme sonuçlarından elde edilen veriler birlikte gösterilmiştir.

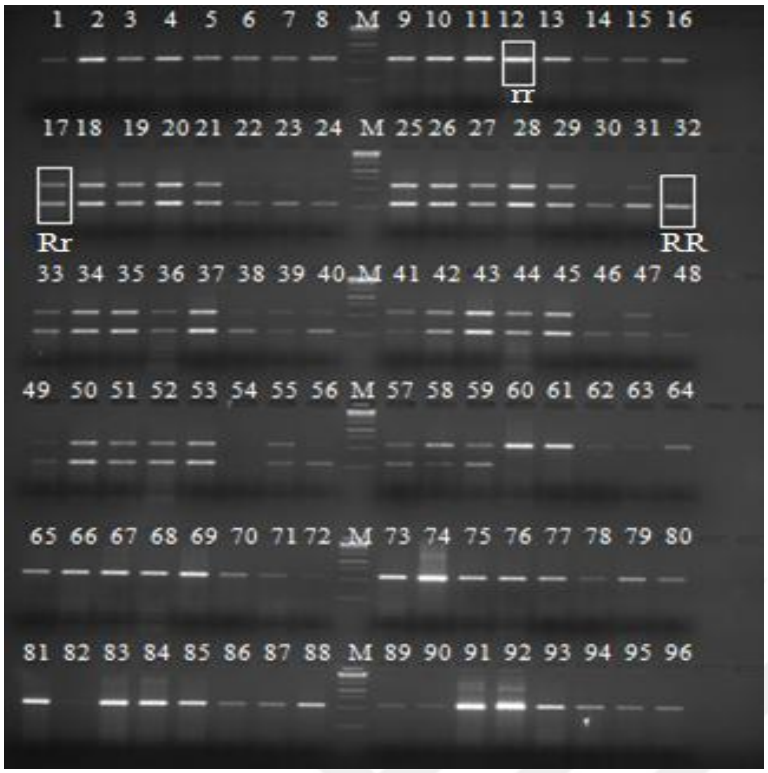
4.2. Moleküler Testleme

Sera koşullarında gözlemler yapılarak TSWV'ye dayanımları skorlanan 96 genotipin (27 adet dayanıklı R. ve 69 adet hassas rr) TSWV'ye dayanımlarının moleküler olarak belirlenmesi için Moury (2000) tarafından geliştirilen SCAR markırı (SCAC568) kullanılmıştır. İlgili gen bölgesi SCAC568 primeri kullanılarak çoğaltılmıştır. Restriksiyon (kesim) enzimleri (Xba ve TaqI) ile kesim aşamasına geçilmeden önce ilgili gen bölgesinin çoğaltıldığının kontrol edilmesi için sadece 8 örneğin PCR ürünlerinden 5 µl alınarak agaroz jele yüklenmiştir. 568bp büyüklüğündeki DNA bant profili Şekil 4.1' de görülmektedir.

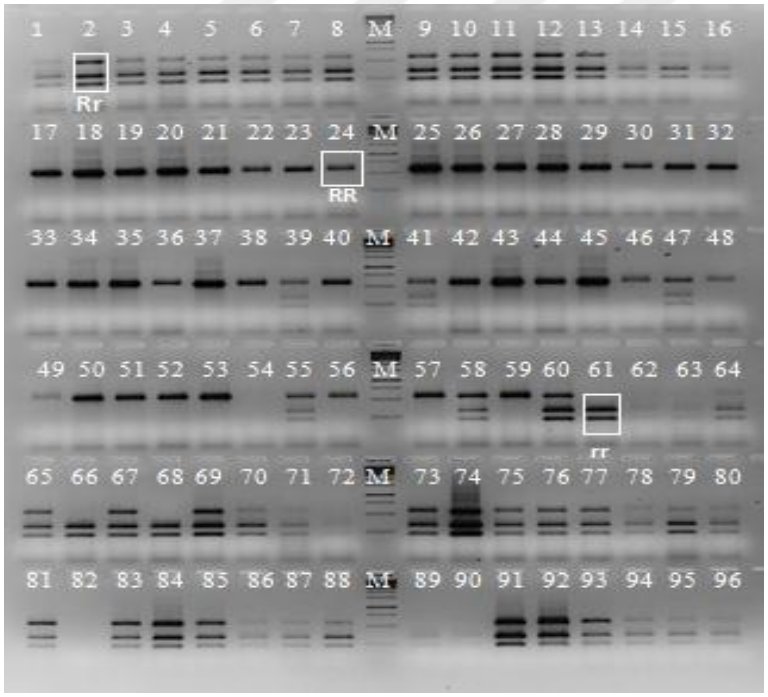


Şekil 4.1. 568 bp büyüklüğündeki ilgili gen bölgesinin çoğaltılması, M: 1 kb DNA leader

568 bp büyüklüğündeki DNA bandının varlığı agaroz jelde görüntülendikten sonra PCR ürünleri Xba ve TaqI kesim enzimleri ile kesilerek inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda örnekler agaroz jelde ayrıştırılarak görüntülenmiş ve genotiplerin dayanıklılık durumları kodominant seviyede (RR, Rr, rr) belirlenmiştir. Doksanaltı adet genotipin şekil 4.2'de Xba enzimine, şekil 4.3'de ise TaqI enzimine ait kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüleri gösterilmektedir.



Şekil 4.2. 96 adet genotipin PCR ürünlerinin Xba enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü, M: 1 kb DNA leader



Şekil 4.3. 96 adet genotipin PCR ürünlerinin TaqI enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü, M: 1 kb DNA leader

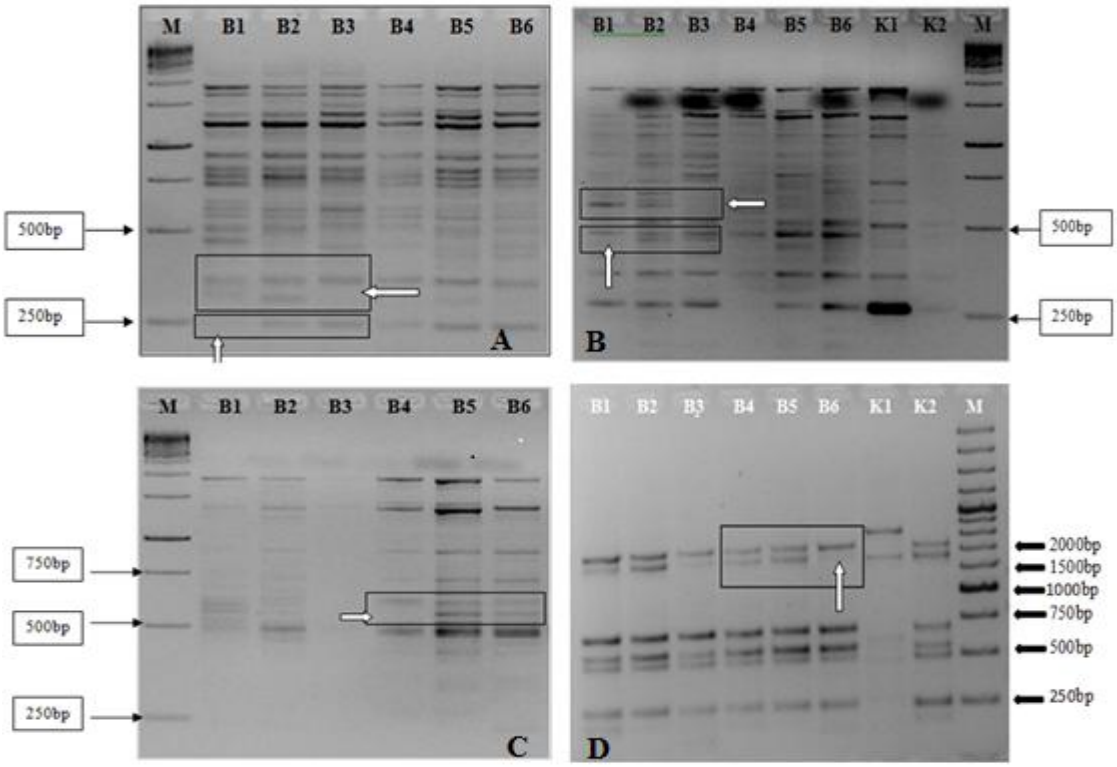
Çizelge 4.1. Fiziksel gözlem ve SCAC568 moleküler testleme sonuçları

Örnek no	Fiziksel gözlem sonuçları	SCAC568 Moleküler testleme sonuçları	Örnek no	Fiziksel gözlem sonuçları	SCAC568 Moleküler testleme sonuçları
1	R.	rr	**49**	rr	RR
2	R.	rr	**50**	rr	RR
3	R.	rr	**51**	rr	RR
4	R.	rr	**52**	rr	RR
5	R.	rr	**53**	rr	RR
6	R.	rr	**54**	rr	-
7	R.	rr	**55**	rr	Rr
8	R.	rr	**56**	rr	RR
9	R.	rr	**57**	R.	RR
10	R.	rr	**58**	rr	Rr
11	R.	rr	**59**	rr	RR
12	R.	rr	**60**	rr	rr
13	R.	rr	**61**	rr	rr
14	R.	rr	**62**	rr	rr
15	R.	rr	**63**	rr	rr
16	R.	rr	**64**	rr	rr
17	R.	RR	**65**	rr	rr
18	R.	RR	**66**	rr	rr
19	R.	RR	**67**	rr	rr
20	R.	RR	**68**	rr	rr
21	R.	RR	**69**	rr	rr
22	R.	RR	**70**	rr	rr
23	R.	RR	**71**	rr	rr
24	R.	RR	**72**	rr	rr
25	R.	RR	**73**	rr	rr
26	R.	RR	**74**	rr	rr
27	rr	RR	**75**	rr	rr
28	rr	RR	**76**	rr	rr
29	rr	RR	**77**	rr	rr
30	rr	RR	**78**	rr	rr
31	rr	RR	**79**	rr	rr
32	rr	RR	**80**	rr	rr
33	rr	RR	**81**	rr	rr
34	rr	RR	**82**	rr	rr
35	rr	RR	**83**	rr	rr
36	rr	RR	**84**	rr	rr
37	rr	RR	**85**	rr	rr
38	rr	RR	**86**	rr	rr
39	rr	Rr	**87**	rr	rr
40	rr	RR	**88**	rr	rr
41	rr	Rr	**89**	rr	rr
42	rr	RR	**90**	rr	rr
43	rr	RR	**91**	rr	rr
44	rr	RR	**92**	rr	rr
45	rr	RR	**93**	rr	rr
46	rr	RR	**94**	rr	rr
47	rr	Rr	**95**	rr	rr
48	rr	RR	**96**	rr	rr

Arazi koşullarında 16 adet genotipin TSWV'ye dayanımı R. olarak karakterize edilirken; SCAC568 moleküler testleme sonuçlarına göre rr olarak karakterize edilmiştir. 31 adet genotip de ise arazi koşullarında rr olarak karakterize edilen TSWV dayanımlarının moleküler olarak 26 adedinde RR ve 5 adedinde ise Rr olduğu belirlenmiştir. Fiziksel gözlem sonuçları ile SCAC(568) moleküler testleme sonuçları arasında %49,47 oranında uyumsuzluk tespit edilmiştir.

4.3. SCAC568 ve SRAP Primerleri Kombinasyonu ile PCR Amplifikasyonu

Çalışmanın bu kısmında; SRAP primerleri ve *Tsw* geni ile bağlantılı SCAC568 primeri kombinasyonları oluşturularak çizelge 3.5'de gösterilen bulklar arasında polimorfizm bulmak amaçlanmıştır. Bunun için 58 primer kombinasyonu kullanılmış olup; SCAC568(R) - Em2, SCAC568(R) - Em4, SCAC568(R) - Em1, SCAC568(R) - Me7, SCAC568(R) - Me11 kombinasyonlarının hassas ve dayanıklı bulklar arasında polimorfizm verdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.4. Polimorfik SCAC568-SRAP kombinasyonlarının DNA bulklarına ait agaroz jel görüntüleri, M: 1kb DNA leader

A) SCAC568(R) - Em2
B) SCAC568(R) - Em4
C) SCAC568(R) - Em1
D) SCAC568(R) - Me7

B1: Homozigot dayanıklı bulk, B2: Heterezigot dayanıklı bulk
B3: Homozigot hassas bulk, B4: Homozigot dayanıklı bulk
B5: Heterezigot dayanıklı bulk, B6: Homozigot hassas bulk
TSWV'ye dayanıklı 2 farklı yabani genotip: K1 (PI152225), K2 (CM334)

Bulklarda polimorfik olduğu belirlenen kombinasyonların 96 adet F4 bitkisinde açılım durumunun belirlenmesi amacı ile PCR analizleri yapılmıştır ancak; hassas ve dayanıklı DNA bulklarından elde edilen polimorfik DNA bantları bireylerde tekrar elde edilememiştir. SRAP ve SCAC568 primerleri için optimize edilen koşullar temel alınarak PCR karışımı bileşenlerinin farklı miktarları ve farklı annealing dereceleri kullanılarak PCR reaksiyonları tekrarlanmıştır ancak bulklardaki polimorfik DNA bantlarının bireylerde elde edilen sonuçlarda tekrar görüntülenememiştir.

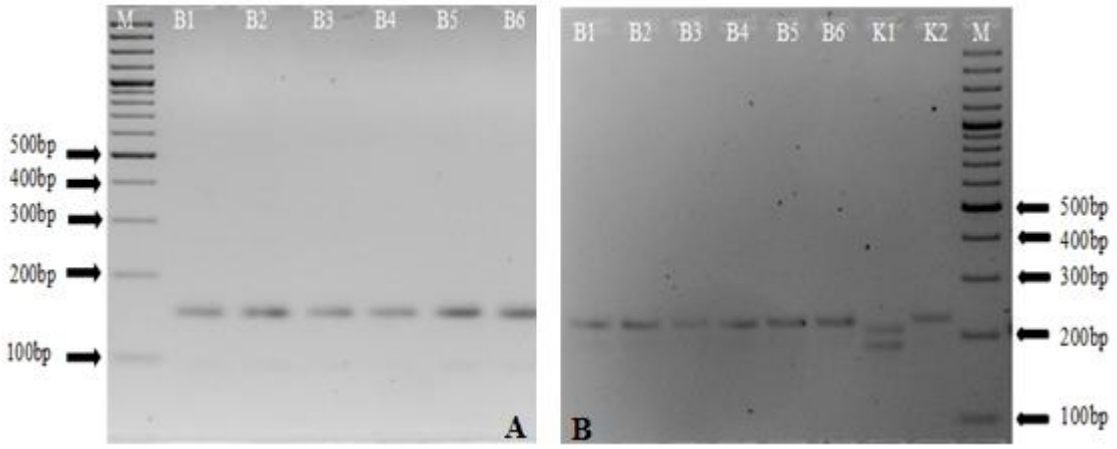
4.4. SSR Primerleri ile PCR Amplifikasyonu

29 adet SSR primerinin hassas ve dayanıklı DNA bulkları ile yapılan PCR analizleri sonrasında ürünler agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. 23 adedinden hassas ve dayanıklı bulklarda monomorfik DNA bandı elde edilirken; 4 adedinden polimorfik DNA bandı elde edilmiştir. 2 adedinde ise PCR ürünü elde edilememiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan SSR primerleri ve PCR sonuçları

SSR primer adı	Polimorfizm	SSR primer adı	Polimorfizm
CAeMS009	-	CAMS871	-
CaES0089	-	Hpms1-1	X
CaES2666	-	Hpms1-117	-
CaES2865	-	Hpms1-148	-
CaES4597	-	Hpms 2-13	-
CAMS-20	+	HpmsE031	+
CAMS-101	-	HpmsE059	-
CAMS-153	-	HpmsE065	-
CAMS-162	-	HpmsE096	-
CAMS-311	-	Hpms2-21	-
CAMS-319	-	Gpms159	+
CAMS-327	+	CAMS-336	-
CAMS-668-2	-	ge241-820pms0561W	-
CAMS-838	-	ge70-390pmA0168C	X
CAMS-864	-		

+ Polimorfizm var
- Polimorfizm yok
X PCR ürünü elde edilemedi

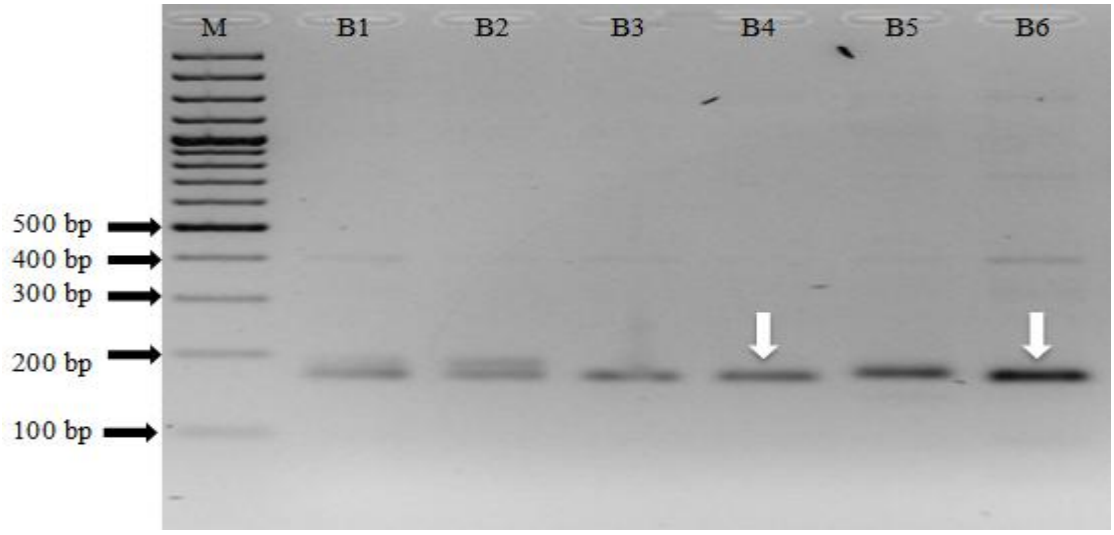


Şekil 4.5. Monomorfik SSR primerlerinden Caes0089(A) ve CAMS-101(B) e ait agaroz jel görüntüsü

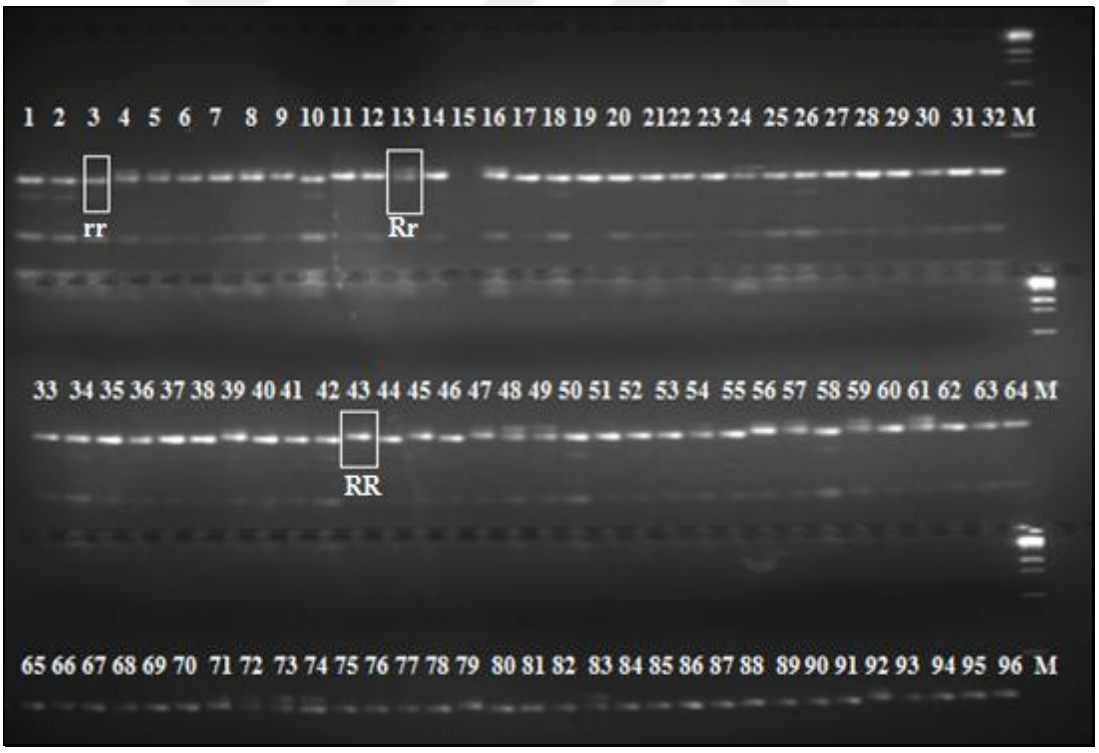
B1: Homozigot dayanıklı bulk, B2: Heterezigot dayanıklı bulk
B3: Homozigot hassas bulk, B4: Homozigot dayanıklı bulk
B5: Heterezigot dayanıklı bulk, B6: Homozigot hassas bulk
TSWV'ye dayanıklı 2 farklı yabani genotip: K1 (PI152225), K2 (Cm335)
M: 1kb DNA leader

CAMS-020, CAMS-327, Gpms 159 ve Hpmse031 SSR primerleri PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonrasında hassas ve dayanıklı bulklar arasında polimorfizm belirlenmiştir. Bulklarda polimorfik olduğu belirlenen SSR primerlerinin 96 adet F4 bitkisinde açılım durumunun belirlenmesi amacı ile PCR analizleri yapılmıştır ve SCAC568 moleküler testlenmesinden elde edilen veriler ile tutarlılıkları incelenmiştir.

CAMS-020 primerinin hassas ve dayanıklı bulklar ile PCR amplifikasyonu sonrasında yaklaşık 180bp büyüklüğündeki DNA bandının polimorfik olduğu belirlenmiştir ve şekil 4.6'da agaroz jel görüntüsü gösterilmiştir. Elde edilen polimorfizmin F4 bireyleri ile analizleri yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Bireylere ait agaroz jel görüntüsü şekil 4.7'de gösterilmiştir.

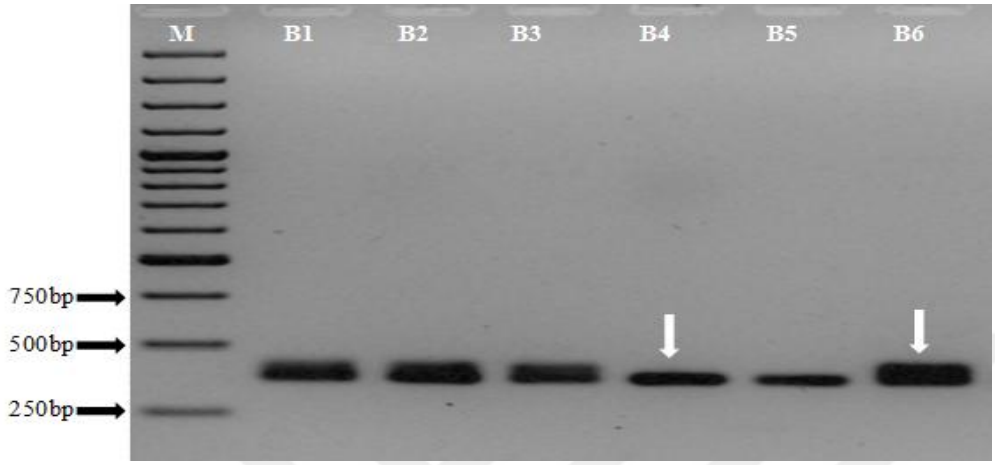


Şekil 4.6. CAMS-020 primerinin bulklardaki agaroz jel görüntüsü
B1: Homozigot dayanıklı bulk (RR), B2: Heterezigot dayanıklı bulk (Rr)
B3: Homozigot hassas bulk, B4: Homozigot dayanıklı bulk (RR)
B5: Heterezigot dayanıklı bulk (Rr), B6: Homozigot hassas bulk (rr)
M: 1kb DNA leader (100 bp)



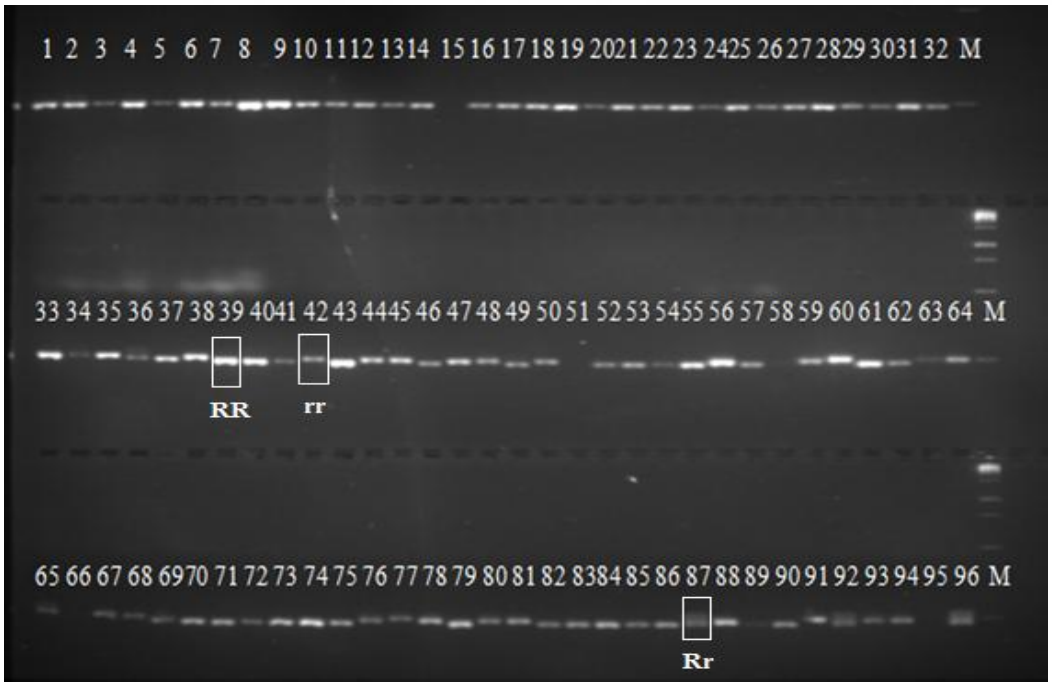
Şekil 4.7. CAMS-020 primerinin 96 genotipe ait agaroz jel görüntüsü
3,13,43 nolu örneklerde gösterildiği gibi diğer genotiplerde skorlanmıştır
M: 1kb DNA leader

CAMS-327 primerinin hassas ve dayanıklı bulklar ile PCR amplifikasyonu sonrasında yaklaşık 450 bp büyüklüğündeki DNA bandının polimorfik olduğu belirlenmiştir ve şekil 4.8'de agaroz jel görüntüsü gösterilmiştir. Elde edilen polimorfizmin F4 bireyleri ile analizleri yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Bireylere ait agaroz jel görüntüsü şekil 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.8. CAMS327 primerinin bulklarda agaroz jel görüntüsü

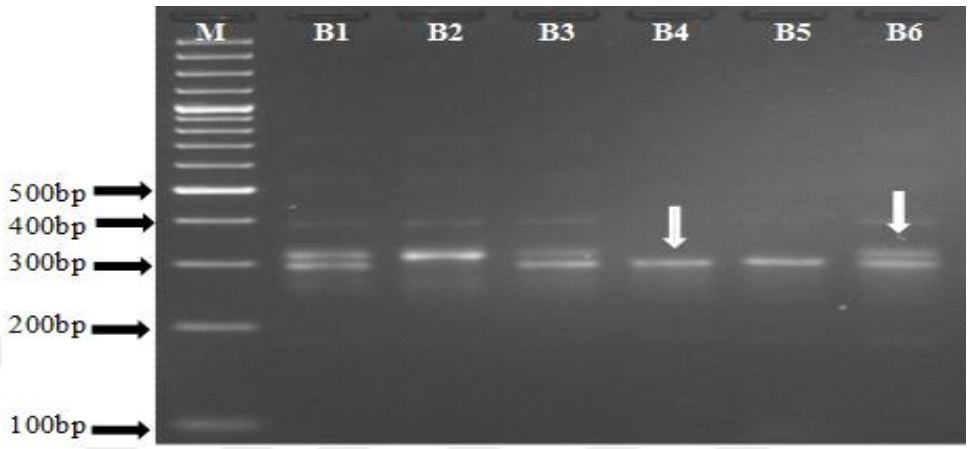
B1: Homozigot dayanıklı bulk (RR), B2: Heterezigot dayanıklı bulk (Rr)
B3: Homozigot hassas bulk, B4: Homozigot dayanıklı bulk (RR)
B5: Heterezigot dayanıklı bulk (Rr), B6: Homozigot hassas bulk (rr)
M: 1kb DNA leader



Şekil 4.9. CAMS327 primerinin 96 genotipe ait agaroz jel görüntüsü

39, 42, 87 nolu örneklerde gösterildiği gibi diğer genotiplerde skorlanmıştır
M: 1kb DNA leader

Gpms 159 primerinin bulklar ile PCR amplifikasyonu sonrasında yaklaşık 300 bp büyüklüğündeki DNA bandının hassas ve dayanıklı bulklar arasında polimorfik olduğu belirlenmiştir ve şekil 4.10'da agaroz jel görüntüsü gösterilmiştir. Elde edilen polimorfizmin F4 bireyleri ile analizleri yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Bireylere ait agaroz jel görüntüsü şekil 4.11'de gösterilmiştir.

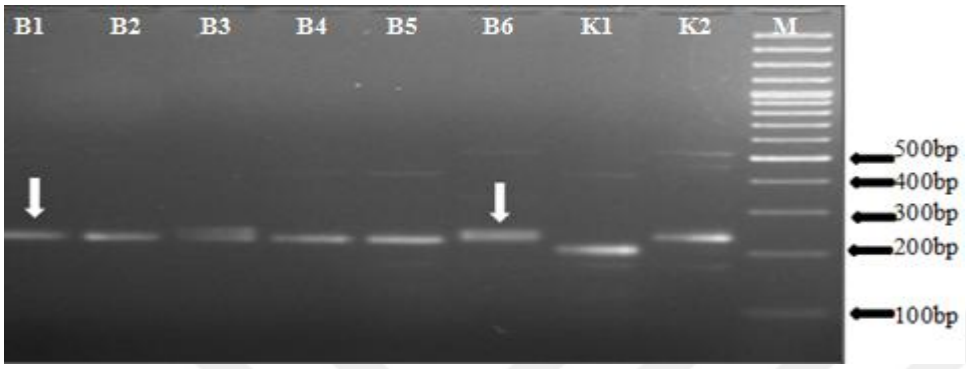


Şekil 4.10. Gpms 159 primerinin bulklarda agaroz jel görüntüsü
B1: Homozigot dayanıklı bulk, B2: Heterezigot dayanıklı bulk
B3: Homozigot hassas bulk, B4: Homozigot dayanıklı bulk
B5: Heterezigot dayanıklı bulk, B6: Homozigot hassas bulk
M: 1kb DNA leader

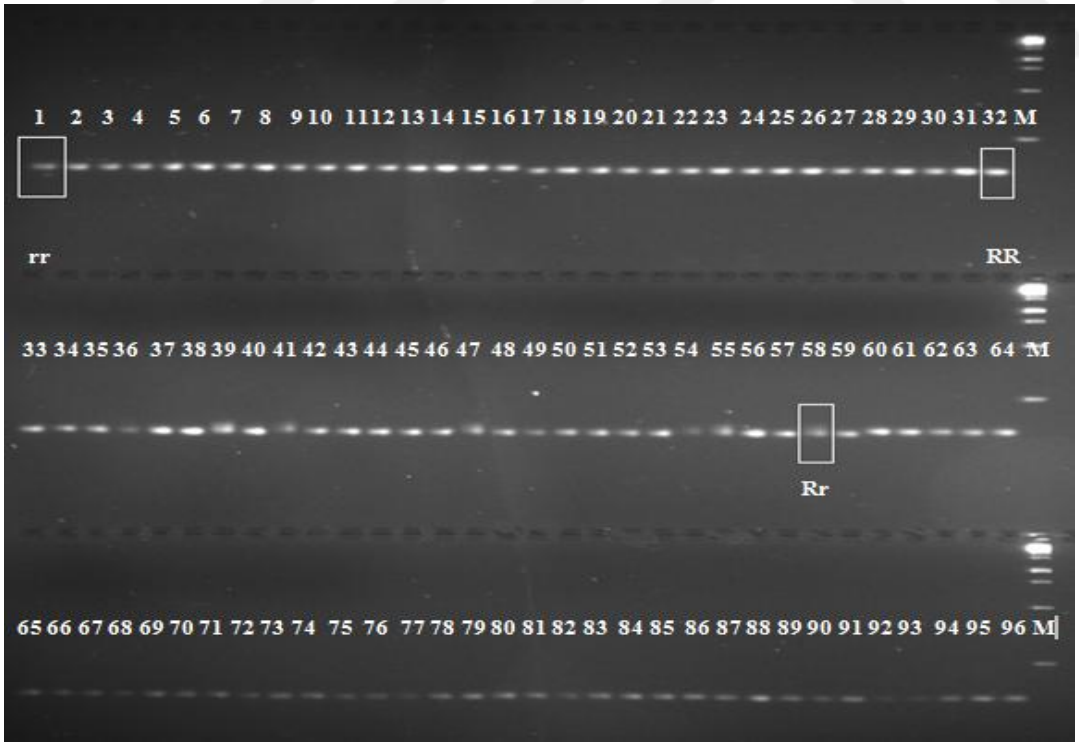


Şekil 4.11. Gpms 159 primerinin 1-64 arasındaki genotiplere ait agaroz jel görüntüsü
40, 43nolu örneklerde gösterildiği gibi diğer genotiplerde skorlanmıştır
M: 1kb DNA leader

HpmsE031 primerinin bulklar ile PCR amplifikasyonu sonrasında yaklaşık 250bp büyüklüğündeki DNA bandının hassas ve dayanıklı bulklar arasında polimorfik olduğu belirlenmiştir ve şekil 4.12'de bu primerin PCR ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü gösterilmiştir. Elde edilen polimorfizmin F4 bireyleri ile analizleri yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Bireylere ait agaroz jel görüntüsü şekil 4.13'de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. HpmsE031 primerinin bulklarda agaroz jel görüntüsü
B1: Homozigot dayanıklı bulk, B2: Heterezigot dayanıklı bulk
B3: Homozigot hassas bulk, B4: Homozigot dayanıklı bulk
B5: Heterezigot dayanıklı bulk, B6: Homozigot hassas bulk
M: 1kb DNA leader



Şekil 4.13. HpmsE031 primerinin 96 genotipe ait agaroz jel görüntüsü
1, 32, 58 nolu genotiplerde gösterildiği gibi diğer genotiplerde skorlanmıştır
M: 1kb DNA leader (250 bp)

CAMS020, CAMS327, Gpmse159 ve Hpmse031 SSR primerleri ve SCAC568 testlemesinden elde edilen sonuçların moleküler karakterizasyonu Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. SCAC568 primeri ve polimorfik SSR primerlerinden elde edilen sonuçlar

Örnek	SCAC 568	CAMS 020	CAMS 327	Gpms 159	Hpmse 031	Örnek	SCAC 568	CAMS 020	CAMS 327	Gpms 159	Hpmse 031
1	rr	rr	rr	-	rr	**49**	RR	Rr	RR	-	RR
2	rr	rr	rr	RR	rr	**50**	RR	rr	rr	rr	RR
3	rr	rr	RR	RR	rr	**51**	RR	rr	-	RR	RR
4	rr	RR	rr	RR	rr	**52**	RR	rr	RR	RR	RR
5	rr	RR	RR	RR	rr	**53**	RR	rr	RR	rr	RR
6	rr	RR	rr	RR	rr	**54**	-	rr	RR	rr	Rr
7	rr	RR	RR	RR	rr	**55**	Rr	rr	RR	rr	Rr
8	rr	RR	Rr	RR	rr	**56**	RR	RR	rr	rr	RR
9	rr	RR	Rr	RR	rr	**57**	RR	RR	RR	rr	RR
10	rr	rr	RR	RR	rr	**58**	Rr	rr	-	RR	Rr
11	rr	RR	RR	RR	rr	**59**	RR	Rr	rr	rr	RR
12	rr	RR	RR	RR	rr	**60**	rr	rr	rr	RR	rr
13	rr	Rr	RR	RR	rr	**61**	rr	Rr	RR	rr	rr
14	rr	rr	RR	RR	rr	**62**	rr	rr	RR	rr	rr
15	rr	-	-	RR	rr	**63**	rr	rr	rr	-	rr
16	rr	Rr	RR	RR	rr	**64**	rr	rr	rr	rr	rr
17	RR	rr	RR	-	RR	**65**	rr	rr	rr	rr	rr
18	RR	rr	RR	rr	RR	**66**	rr	rr	-	RR	rr
19	RR	rr	rr	rr	RR	**67**	rr	rr	rr	rr	rr
20	RR	rr	RR	rr	RR	**68**	rr	rr	rr	RR	rr
21	RR	rr	rr	rr	RR	**69**	rr	rr	RR	RR	rr
22	RR	rr	rr	rr	RR	**70**	rr	rr	RR	RR	rr
23	RR	rr	rr	rr	RR	**71**	rr	RR	RR	RR	rr
24	RR	rr	RR	rr	RR	**72**	rr	Rr	RR	-	rr
25	RR	rr	rr	rr	RR	**73**	rr	Rr	RR	RR	rr
26	RR	rr	RR	rr	RR	**74**	rr	Rr	RR	RR	rr
27	rr	rr	RR	rr	rr	**75**	rr	rr	RR	RR	rr
28	rr	rr	rr	rr	rr	**76**	rr	rr	rr	rr	rr
29	rr	rr	RR	rr	rr	**77**	rr	rr	rr	RR	rr
30	rr	rr	RR	rr	rr	**78**	rr	rr	rr	RR	rr
31	rr	rr	rr	rr	rr	**79**	rr	RR	RR	RR	rr
32	rr	rr	RR	rr	rr	**80**	rr	rr	rr	RR	rr
33	rr	rr	rr	rr	rr	**81**	rr	rr	rr	rr	rr
34	rr	rr	rr	rr	rr	**82**	rr	rr	RR	RR	rr
35	rr	rr	rr	rr	rr	**83**	rr	Rr	RR	rr	rr
36	rr	rr	Rr	-	rr	**84**	rr	rr	RR	rr	rr
37	rr	rr	RR	rr	rr	**85**	rr	rr	RR	-	rr
38	rr	rr	rr	RR	rr	**86**	rr	rr	RR	RR	rr
39	rr	RR	RR	rr	rr	**87**	rr	rr	Rr	RR	rr
40	rr	rr	RR	RR	rr	**88**	rr	rr	RR	RR	rr
41	rr	rr	RR	rr	rr	**89**	rr	rr	RR	RR	rr
42	rr	rr	rr	rr	rr	**90**	rr	rr	RR	RR	rr
43	rr	RR	RR	rr	rr	**91**	rr	rr	rr	RR	rr
44	rr	rr	rr	RR	rr	**92**	rr	RR	Rr	rr	rr
45	rr	RR	rr	rr	rr	**93**	rr	rr	RR	RR	rr
46	rr	rr	RR	rr	rr	**94**	rr	rr	RR	rr	rr
47	rr	RR	rr	rr	rr	**95**	rr	rr	-	rr	rr
48	rr	Rr	rr	rr	rr	**96**	rr	rr	Rr	-	rr

Polimorfik olduğu belirlenen 4 adet SSR primerinin 96 adet genotip ile PCR amplifikasyonu sonrasında, agaroz jel görüntüleri değerlendirilerek, SCAC568 moleküler testlemesinden elde edilen sonuçlar ile tutarlılıkları karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.3). Buna göre CAMS020, CAMS327 ve Gpmse159 primerlerinden elde edilen sonuçların, SCAC568 testlemesi sonuçları arasında tutarlılık olmadığı belirlenirken; HpmsE031 markırı ile yapılan moleküler testleme sonuçları arasında % 100 oranında tutarlılık olduğu belirlenmiştir.

HpmsE031 markırının (TC)6 motifinde olduğu (Yi vd 2006) ve yapılan bioinformatik analizi sonucu TSWV'ye dayanıklılık kaynağı *C. chinense* genomunda 10. kromozomda 268,700,000 bp ile 285,300,00 bp genom bölgesini kapsayan alan içinde bulunduğu belirlenmiştir. Bu çalışma dahilinde; HpmsE031 markırına ait sekans ile BLAST analizi yapıldığında toplam 4 bp uzunluğunda iki indel bölgesi tespit edilmiştir. *C. annuum* 'CM334', *C.annuum* var. glabriusculum ve *C. annuum* L. TSWV'ye hassas biber genotiplerinde 171 bp uzunluğunda, *C. chinensis* TSWV'ye dayanıklılık kaynağında ise 167 bp büyüklüğünde DNA bölgesi belirlenmiştir. Bahsi geçen indel bölgelerine ait BLAST analizi aşağıda sunulmuştur.

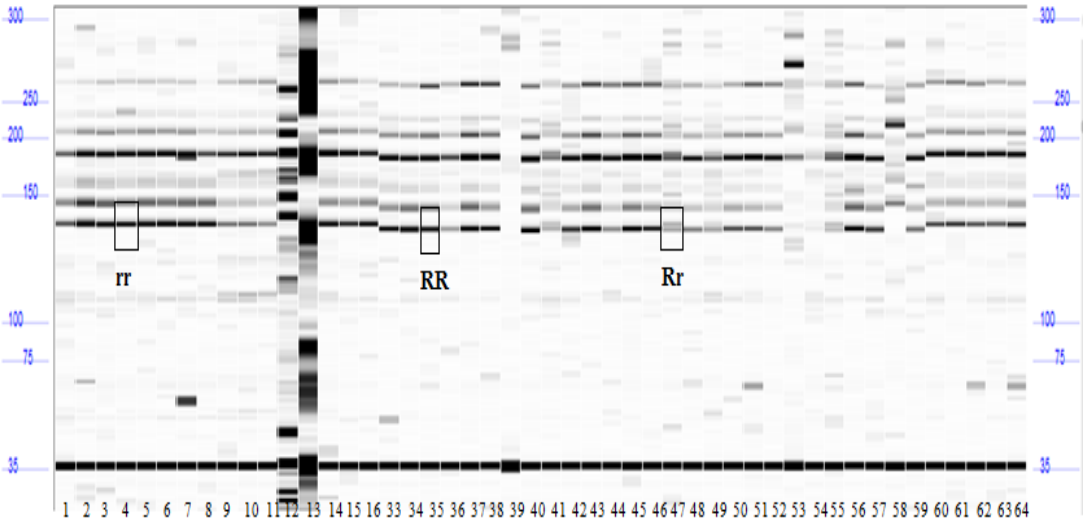
```
Q    : 1    ccctaaatcaaccccaaattcaatctctctctctctaaaaatcctctctctctctctt 60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||  |||||||||
S    : 2687 ccctaaatcaaccccaaattcaatctctctctct--aaaaatcctct--ctctctctt 2742


Q     : 61  cgatcccaaattgttaaaacccaaaattcgttcacttttttcttcaatttttgttaacaat 120
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
S    : 2743 cgatcccaaattgttaaaacccaaaattcgttcacttttttcttcaatttttgttaacaat 2802


Q    : 121  ttgcgaagaaaagcaaggctggcgattggttttgcagtcaggtaatggggg 171
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
S    : 2803 ttgcgaagaaaagcaaggctggcgattggttttgcagtcaggtaatggggg 2853
```

Şekil 4.14. HpmsE031 markırının BLAST analizi sonuçları

Hpmse031 markırının çoğalttığı genom bölgesinde dayanıklı ve hassas bireylerin arasında arasında baz sayısı farkının az olmasından (4bp) dolayı daha net sonuç elde etmek amacı ile PCR ürünleri ayrıca *Fragment Analyzer* Capillary Elektroforesis sisteminde görüntülenmiştir ve elde edilen jel görüntüsü şekil 4.15'de gösterilmiştir. Agaroz jel görüntülemesi ile *Fragment Analyzer* Capillary Elektroforesis sisteminden elde edilen sonuçların paralellik gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.15. Fragment Analyzer™ ile yapılan analiz sonrasında HpmsE031 markırının 48 adet genotipe ait sanal jel görüntüsü

HpmsE031 SSR markırının güvenilirliğinin artırılması amacı ile farklı genetik altyapıya sahip populasyonlarda toplam 381 adet biber genotipinde denemesi yapılmıştır. Bu genotiplere ait SCAC568 primeri ile PCR amplifikasyonu ve sonrasında kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüleri, HpmsE031 primeri ile PCR amplifikasyonuna ait agaroz jel görüntüleri ve elde edilen sonuçların moleküler karakterizasyonuna ait veriler çalışmanın ekler bölümünde gösterilmiştir. Çizelge 4.4'de 381 adet örneğin temin edildiği firmalara göre gruplandırılarak adlandırılması, grupların örnek sayıları ve Hpmse031 markırından elde edilen sonuçlar ile SCAC568 moleküler testlemesinin sonuçlarının tutarlılık yüzdelerine ait veriler gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. SCAC568 ve Hpmse031 markırlarından elde edilen sonuçların moleküler karakterizasyonu

Örneklerin yer aldığı grupları adları	Örnek sayısı	SCAC568 moleküler testlemesi ile Hpmse031 testlemesinin tutarlılık yüzdeleri	*
P1	96	%96	EK3
P2	40	%99,6	EK6
P3	15	%100	EK8
P4	52	%99,5	EK11
P5	82	%99,2	EK13
P6	96	%98	EK17

* SCAC568 ve Hpmse031 markırlarından elde edilen sonuçların moleküler karakterizasyonunun yer aldığı tablolar

5. TARTIŞMA

Bitki genetik dayanıklılığını kullanmak, bitki virüs hastalıkları ile kimyasal yöntemlerin yetersiz kalmasından dolayı en etkili ve ekonomik metottur. Biberde TSWV'ye karşı dayanıklılığın dominant tek gen (*Tsw*) tarafından hipersensitif reaksiyon oluşturarak sağlandığı Jahn vd (2000) tarafından ortaya konulmuştur. *Tsw* geninin diğer tospovirüs türlerinden tomato chlorotic spot virüs (TCSV) ve groundnut ring spot virüsüne (GRSV) karşı dayanıklılık sağlamadığı (Boiteux ve De Avila 1994), impatiens necrotic spot virüsün (INSV) iki izolatına karşı dayanıklılık sağladığı Roggero vd (1996) tarafından belirlenmiştir.

TSWV'ye dayanıklı çeşit geliştirilmesi için yürütülen ıslah çalışmalarında *Tsw* genini dayanıklı genotiplerden istediğimiz kültür çeşidine aktarmak için iki yöntem mevcuttur. Bunlardan ilki klasik geri melezleme yöntemidir ve her geriye melezlemeden önce virüs inokülasyonu yapılmaktadır. TSWV inokülasyonundan sonra gözlemler yapılarak ya da serolojik yöntemler ile belirlenen dayanıklı bitkiler geriye melezlemede kullanılmaktadır. TSWV'nin birçok Avrupa ülkesinde karantina altına alınan patojenler arasında olması sebebi ile vektör üretimi, ya da inokulumun hazırlanması sırasında kontrollü şartlarda çalışılması ve bulaşmaların önlenmesinin gerekliliğinin yanı sıra; *Tsw* geni ile sağlanan dayanıklılığın TSWV strainleri tarafından kırıldığı birçok ülkede yapılan çalışmalarda ortaya konulmuş ve elde edilen sonuçların yanlış yorumlanmasına neden olabileceği Moury (1997) tarafından belirtilmiştir. Yukarıda sayılan dezavantajların yanısıra bu yöntemde homozigot (RR) ve heterezigot (Rr) dayanıklı bireylerin ayırt edilememesi ikinci yöntem 'moleküler markır destekli seleksiyon (MAS)'un önem kazanmasına yol açmaktadır.

TSWV dayanımlı biber hat ve çeşitleri geliştirilmesi amacı ile MAS amaçlı kullanılabilir bir CAPS markırı Moury vd (2000) tarafından geliştirilmiştir. Haritalama populasyonu 'PI 195301 (hassas ebebeyn) x PI 152225 (dayanıklı ebebeyn)' melezlemesinden oluşan F_2 populasyonu olan çalışmada RAPD markırının klonlanması ve DNA dizisinin belirlenmesinden sonra, DNA dizisi kullanılarak SCAR primeri sentezlenmiş (SCAC568) ve bu primer ile PCR amplifikasyonunda 568 bp büyüklüğünde tek bant elde ettiklerini belirtmişlerdir. SCAR primeri kesim enzimi (Xba, TaqI, HaeIII) kullanılarak CAPS markırına dönüştürülmüş ve CAPS markırının *Tsw* genine 0.9 ± 0.6 cM uzaklıkta olduğu belirtilmiştir. Ancak farklı genetik yapıya sahip biber genotiplerinde yapılan testlemelerde heterozigot\homozigot düzeyde sonuçların değerlendirilmesinde tutarsızlıkların olabildiği gözlenmiştir. İkten vd (2010) tarafından yapılan bir çalışmada bu tutarsızlıkların önlenmesi amacıyla Moury vd (2000) tarafından belirtilen yöntemde uygulanan kesim aşamasına ilaveten farklı bir kesim enzimi ile ikinci bir kesim aşamasının gerekliliği vurgulamıştır. İki ayrı kesim enzimi kullanılarak yapılan testlemelerde farklı genetik yapıya sahip ıslah materyallerinin TSWV'ye dayanımlarının değerlendirilmesinde yaşanan tutarsızlıklar önlense de; iki farklı kesim sonucunun değerlendirilmesinde yaşanan zorluklar, zaman kaybı, hata yapma ihtimali ve maliyetin artması gibi olumsuzlukları beraberinde getirmektedir. Bu nedenlerden ötürü MAS amaçlı kullanılabilir yeni markır(lar)ın

geliştirilmesi bu çalışma dahilinde amaçlanmıştır. Elde edilen markır ile yapılan testlemelerde halen kullanılan metotta yer alan enzimlerle kesim aşamasına gerek kalmayarak sadece PCR ile testleme tamamlanabileceği için yeni testleme metodu önceki metottan daha pratik, güvenilir ve ekonomik olacaktır.

Bu çalışma birbirini takip eden üç aşamadan oluşmuştur. İlk aşamada fiziksel ve moleküler olarak çalışma materyallerinin TSWV'ye dayanımları karakterize edilmiştir (bknz. Çizelge 4.1.). Toplam 47 genotipin fiziksel gözlem sonuçları ile moleküler testleme sonuçları arasında uyumsuzluk belirlenmiştir. 16 genotip arazi koşullarında R., moleküler olarak rr; 26 genotip arazi koşullarında rr, moleküler olarak RR ve 5 genotip ise arazi koşullarında rr, moleküler olarak Rr olarak karakterize edilirken; fiziksel gözlem sonuçları ile moleküler testleme sonuçları arasında %49,47 oranında tutarsızlık olduğu belirlenmiştir. Bu durumun, TSWV simptomlarının biber bitkilerinde enfeksiyona neden olan diğer virüs hastalıkları simptomları ile karıştırılmış olabileceğinden, hastalığın yeni bir ırkının varlığından, homozigot hassas genotipteki (rr) bitkilere hastalığın bulaştırılmamış olmasından ya da CAPS markırı ile gen arasındaki bağlantının kırılmış olabileceğinden kaynaklanabileceğine karar verilmiştir. Thrips populasyonunun yıldan yıla büyük değişiklik gösterdiği (Saidi 2008), thripslerin bütün bitkilere TSWV'yi bulaştırmama olasılığı ve bitkilerde farklı büyüme dönemlerinde infeksiyon oluşturabilmeleri (Mandal 2001) nedeni ile arazi koşullarında TSWV'ye dayanıklılıkla ilgili değerlendirmelerde sınırlamaların oluşabildiği yapılan farklı çalışmalar ile ortaya konulmuştur.

Çalışmanın ikinci aşamasında; mevcut testleme yönteminde kullanılan primer çiftinin (SCAC568 F,R) çoğalttığı gen bölgesinden yararlanmak amacı ile bu primerler SRAP primerleri ile eşleştirilmiş ve toplamda 58 kombinasyon oluşturularak hassas\dayanıklı bulklar arasında polimorfizm bulmak amaçlanmıştır. SCAC568-SRAP primer kombinasyonlarından 5 tanesinin hassas ve dayanıklı DNA bulkları arasında polimorfik olduğu belirlenmiş olup; F4 bireylerinde açılım durumlarının belirlenmesi için PCR amplifikasyonları yapılmıştır. Ancak bulklarda elde edilen polimorfik DNA bant profilleri bireylerde tekrar elde edilememiştir. Tekrar edilebilirliğini sağlayabilmek amacıyla SRAP ve SCAC568 primerleri için optimize edilen koşullar temel alınarak; farklı annealing dereceleri ve PCR tepkime bileşenlerinin farklı miktarları denenmesine rağmen sonuç alınamamıştır. Bu çalışma dahilinde yapılan bioinformatik analizler sonucunda; biber genomunda SCAC568 markırının en az 20 tane analog gen bölgesinin varlığı belirlenmiştir. Aynı primer kombinasyonu ile tekrarlanan farklı PCR amplifikasyonlarında primerin farklı analog gen bölgelerine bağlanma olasılığı nedeni ile bulklarda polimorfik olan SCAC568-SRAP kombinasyonlarının tekrar edilemeyeceğine karar verilmiştir.

Çalışmanın üçüncü aşamasında ise biber için geliştirilmiş ve çoğu 10. kromozom üzerinde ve *Tsw* genine yakın bölgelerde haritalanmış 29 adet SSR primeri kullanılarak bulk segregasyon analizi yöntemi ile hassas ve dayanıklı bulklar arasında polimorfizm veren primerlerin belirlenmesi ve elde edilen polimorfizmin *Tsw* geni ile linkaj durumunda olanlarını bulmak amaçlanmıştır. Yirmi dokuz adet SSR primerinden 23 adedinde hassas ve dayanıklı bulklarda monomorfik DNA bandı elde edilirken; 4 adedinde polimorfik DNA bandı elde edilmiştir. 2 adedinde ise PCR ürünü elde edilememiştir.

Gpms 159, CAMS-327, CAMS-020 ve HpmsE031 olarak adlandırılan SSR primerleri ile bulklarda polimorfik DNA bandı elde edilmiştir. F4 bireylerinde polimorfik bant profillerinin belirlenmesi amacı ile PCR analizleri yapılmıştır ve elde edilen polimorfizm bireylerde tekrarlanabilmiştir. Ancak; Gpms 159, CAMS-327 ve CAMS-020 SSR primerlerinden elde edilen sonuçların SCAC568 primeri kullanılarak elde edilen moleküler sonuçlar ile tutarlılık göstermediği belirlenirken; bu durumun bahsi geçen SSR markır lokuslarının gene uzak olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

F4 kademesindeki 96 genotipin; HpmsE031 SSR primerinden elde edilen sonuçlar ile SCAC568 primeri ile elde edilen sonuçlar arasında rekombinasyon görülmemiş ve %100 oranında uyum belirlenmiştir. Hpmse031 markırının farklı genetik yapılardaki güvenilirliğinin test edilmesi amacı ile 381 adet biber genotipinde taraması gerçekleştirilmiştir. Hpmse031 ve SCAC568 moleküler sonuçları arasında P1 96 örnek %96, P2 40 örnek %99,6, P3 15 örnek %100, P4 52 örnek %99,5, P5 82 örnek %99,2, P6 96 örnek %98 oranında uyum gösterdiği belirlenmiştir. Örneklerin farklı genetik altyapılardan gelmesinin sonucu olarak, SCAC568 ve Hpmse031 testlemesinin sonuçları arasında P1'de %4, P2'de %0,4, P4'de %0,5, P5'de %0,8 ve P6'da %2 lik fark oluştuğu ve markır ile gen arasındaki bağlantının kırılmış olabileceğinden kaynaklandığına karar verilmiştir.

HpmsE031 markırının $(TC)_6$ motifinde olduğu (Yi vd 2006) ve yapılan bioinformatik analizi sonucu TSWV'ye dayanıklılık kaynağı *C. chinense* genomunda 10. kromozomda 268,700,000 bp ile 285,300,00 bp genom bölgesini kapsayan alan içinde bulunduğu belirlenmiştir. Bu çalışma dahilinde; HpmsE031 markırına ait sekans ile BLAST analizi yapıldığında toplam 4 bp uzunluğunda iki indel bölgesi tespit edilmiştir. *C. annuum* 'CM334', *C.annuum* var. glabriusculum ve *C. annuum* L. TSWV'ye hassas biber genotiplerinde 171 bp uzunluğunda, *C. chinensis* TSWV'ye dayanıklılık kaynağında ise 167 bp büyüklüğünde DNA bölgesi belirlenmiştir. Hassas ve dayanıklı bireyler arasında baz sayısı farklılığı az olduğu (4bp) ve bazı durumlarda agaroz jelde özellikle heterezigot bireylerin ayrımları güçleşebildiği için HpmsE031 primerinden elde edilen PCR ürünleri ayrıca Fragment Analyzer™ cihazına da yüklenmiştir. Bu cihaz sayesinde moleküler verilerin karakterizasyonunda hem daha doğru sonuçlar elde edilmiş hem de görüntüleme süreci oldukça kısaltılabileceği için testlenecek örnek sayısının fazla olduğu durumlarda kullanışlı olabileceği belirlenmiştir.

6. SONUÇ

Hastalık ve zararlılara dayanıklı çeşit geliştirilmesi için yapılan ıslah çalışmalarında dayanıklılık testlemeleri önemli bir basamağı oluşturmaktadır. Çok sayıda bitkinin kısa sürede testlenmesi için mümkün olan en kolay, güvenilir ve düşük maliyetli testleme yönteminin uygulanması idealdir. Bu nedenle bir çok tarım ürününde hastalık ve zararlılara dayanıklı çeşit geliştirmek amacıyla yapılan ıslah çalışmalarında kullanılmak üzere moleküler markır geliştirme çalışmaları yapılmaktadır. Moleküler testleme metodlarını daha iyi hale getirmek için ilgili gen bölgesine daha yakın markırlar bulmak ya da mevcut metodu kısaltıp daha pratik hale getirmek için çeşitli bitkilerde çalışmalar devam etmektedir.

Biberde, TSWV'ye dayanıklılık testlemeleri için mevcut moleküler testleme metodu iki defa enzim kesim basamağı içermekte ve heterozigot/ homozigot düzeyde yapılan testlemelerde sonuçların değerlendirilmesinde bazı zorluklar yaşanmaktadır (İkten vd 2010). Bu işlemler hem zaman kaybına neden olmakta hem de hata yapma ihtimalini arttırmaktadır. Bu nedenle mevcut moleküler testleme yönteminin iyileştirilmesi, kesim basamaklarının elimine edilebilmesi için yeni markırların geliştirilebilmesi amacı ile yapılan bu çalışmada iki farklı markır sistemi (SCAC568-SRAP ve SSR) kullanılarak, 96 adet F4 kademesindeki biber ıslah materyallerinde analizler ve değerlendirmeler yapılmıştır.

Arazi koşullarında patojen baskısı altında kalmış F4 kademesindeki biber genotiplerinde gözlemler yapılarak TSWV'ye dayanımları fiziksel olarak karakterize edilmiştir. Aynı biber genotipleri mevcut moleküler testleme yöntemi ile testlenerek TSWV'ye dayanımları kodominant seviyede belirlenerek; fiziksel ve moleküler sonuçların arasındaki uyum incelenmiştir. Buna göre; fiziksel gözlem sonuçları ile SCAC568 moleküler testleme sonuçları arasında %49,47 oranında uyumsuzluk tespit edilmiştir. Ancak; arazi koşullarında TSWV'nin thripsler aracılığı ile doğal infeksiyon oluşturmalarında bazı sınırlayıcı faktörlerin bulunması nedeni ile bu oran beklenen bir sonuç olarak kabul edilebilmektedir.

SCAC568-SRAP primerlerinin eşleştirilmesi ile toplam 58 kombinasyonunun ve biber için geliştirilmiş 29 adet SSR primerinin PCR amplifikasyonu yapılarak hassas\dayanıklı DNA bulkları arasında polimorfizm araştırılmıştır. SCAC568-SRAP primer eşleştirilmesinde 5 adet kombinasyonun; SSR primerlerinde ise 4 adedinin DNA bulkları arasında polimorfik olduğu belirlenmiş ve F4 kademesindeki bireylerde açılım durumları incelenmiştir. SCAC568-SRAP polimorfik primer kombinasyonları bireylerde tekrar edilememiştir. Bu çalışma dâhilinde yapılan bioinformatik analizler sonucunda, biberde SCAC568 markırının 20 den fazla analog gen bölgesinin varlığı tespit edilmiş olduğundan, bulklarda polimorfik kombinasyonların bireylerde tekrarlanamaması beklenen bir sonuç olarak yorumlanabilir. Bulklardan elde edilen polimorfik SSR bant profilleri bireylerde tekrar edilebilmiştir. Bu primerlerden üç tanesinin SCAC568 moleküler testlemesinden elde edilen sonuçlar ile tutarlılık göstermediği belirlenirken; Hpmse031 primerinin SCAC568 moleküler testlenmesinden

elde edilen sonuçlar ile %100 oranında tutarlılık gösterdiği belirlenmiştir. Farklı genetik altyapıya sahip 381 adet biber genotipinde Hpmse031 markırının denemesi yapılarak güvenilirliği araştırılmıştır. Bu genotiplerin SCAC568 moleküler testlemesinden elde edilen sonuçlar ile uyum oranları; P1 96 örnek %96, P2 40 örnek %99,6, P3 15 örnek %100, P4 52 örnek %99,5, P5 82 örnek %99,2, P6 96 örnek %98 olarak hesaplanmıştır.

Hassas ve dayanıklı genotipler arasında 4bp lik baz dizilimi farkı bulunduğu için PCR ürünleri hem agaroz jele hem de Fragment Analyzer™ cihazına yüklenmiştir ve bu sayede agaroz jelde ki ayrışmanın yeterli olup olmadığının incelenmesinin yanı sıra agaroz jelden elde edilen sonuçların desteklenmesi olanağı sağlanmıştır. İki sistemden elde edilen sonuçların birbiri ile tutarlı olduğu belirlenirken; örnek sayısının fazla olduğu zamanlarda Fragment Analyzer™ cihazı ile testleme süresinin kısaltılabileceği ve işgücü bakımından avantaj sağlayabileceği ortaya konulmuştur.

Bu çalışma kapsamında; TSWV'ye dayanıklı çeşit geliştirilmesi için yapılan ıslah çalışmalarında halen kullanılan SCAC568 markırı ile moleküler testlemenin dezavantajlarının giderilmesi için yeni markır(lar)ın geliştirilmesine çalışılmıştır. Bu kapsamda; Hpmse031 SSR markırı ile yapılacak testlemelerde halen kullanılan metotta yer alan iki ayrı enzim kesim basamağına gerek kalmayacağı, sadece PCR kurularak testlemenin tamamlanabileceği, daha pratik, ekonomik ve güvenilir olmasının yanı sıra daha kısa sürede daha fazla bitkinin testlenebileceğinin mümkün olabileceği ortaya konulmuştur. Sonuç olarak, dünya'da ve ülkemizde yapılan TSWV'ye dayanıklılık testlemelerinde Hpmse031 markırının SCAC568 markırına iyi bir alternatif olduğu ortaya konulmuştur.

İleride yapılacak çalışmalarda; Hpmse031 markırının kromozom üzerindeki yeri ve *Tsw* dayanıklılık genine yakınlığı fine mapping (yüksek çözünürlüklü haritalama) yapılarak belirlenmesi planlanabilir.

7. KAYNAKLAR

ADKINS, S. 2000. Tomato spotted wilt virus-positive steps towards negative success. *Molecular Plant Pathology*, 1: 151-157.

AKKAYA, M.S., BHAGWAT, A.A. and CREAGAN, P.B. 1992. Length polymorphism of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics*, 132: 1131-1139.

ARLI SOKMEN, M., MENNAH, H., SEVİK, M.A. and ECEVIT, O. 2005. Occurrence of viruses in field- grown pepper crops and some of their reservoir weed hosts in Samsun, Turkey. *Phytoparasitica*, 33 (4): 347-358.

ARNEDO-ANDRES, M.S., GIL, O.R., LUIS, A.M. and HORMAZA, J.I. 2002. Development of RAPD and SCAR markers linked to the *Pvr4* locus for resistance to PVY in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 105: 1067-1074.

AZERI, T. 1981. Preliminary report of tomato spotted wilt virus and its epidemiy on tobacco in the Canakkale region of Turkiye. *J. Turkish Phytopathology*, 10 (2-3): 79-87.

AZERI, T. 1994. Detection of tomato spotted wilt virus in tobacco and tomato cultivars by enzyme linked immunosorbent assay. *J. Turkish Phytopathology*, 23 (1): 37-46.

BARONE, A., 2004. Molecular marker assisted selection for resistance to pathogens in tomato. MAS in Plants. http://www.fao.org/biotech/docs/Barone.pdf.

BEN CHAIM, A., GRUBE, R.C., LAPIDOT, M., JAHN, M. and PARAN, I. 2001. Identification of quantitative trait loci associated with resistance to cucumber mosaic virus in *Capsicum annuum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 1213–1220.

BERKE, T. and ENGLE, L. 1999. Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 147-156.

BEST, R.J. 1968. Tomato spotted wilt virus. In K. M. Smith and M. A. Lauffer, eds. Advances in virus research. Vol. 13. Academic Press, pp. 65-145, New York.

BLACK, L.L., HOBSS, H.A. and GATTI, J.M. 1991. Tomato spotted wilt virus resistance in *Capsicum chinense* 'PI 152225'and 'PI 159236'. *Plant Disease*, 75: 863.

BLUM, E., LIU, K., MAZOUREK, M., YOO, E.Y., JAHN, M.M. and PARAN. I. 2002. Molecular mapping of the C locus for presence of pungency in *Capsicum*. *Genome*, 45: 702-705.

BOITEUX, L. S., NAGATA, T., DUTRA, W. P. and FONSECA, M. E. N. 1993. Sources of resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) in cultivated and wild-species of Capsicum. *Euphytica*, 67: 89–94.

BOITEUX, L.S. and de AVILA, A.C. 1994. Inheritance of a resistance specific to tomato spotted wilt *tospovirus* in *Capsicum chinense* 'PI 159236'. *Euphytica*, 75(1): 139-142.

BOITEUX, L.S. 1995. Allelic relationships between genes for resistance to tomato spotted wilt *tospovirus* in *Capsicum chinense*. *Theorotical and Applied Genetics*, 90: 146–149.

BOUKEMA, I.W. 1982. Resistance to a new strain of TMV in *Capsicum chacoense* Hunz. *Capsicum Newsletter*, 1: 49–51.

BRITTLEBANK, C.C. 1919. Tomato diseases. *Journal of Agriculture Victoria*, 27: 231-235.

BROUN, P. and TANSKLEY, S.D. 1996. Characterization and genetic mapping of simple repeat sequences in the tomato genome. *Molecular and General Genetics*, 250 (1): 39-49.

BUDAK, H., SHEARMAN, R.C., PARMAKSIZ, I., GAUSSOIN, R.E., RIORDAN, T.P. and DWEIKAT, I. 2004. Molecular characterization of buffalo gross germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 328-334.

CARANTA, C., PALLOIX, A., GEBRE-SELASSIE, K., LEFEBVRE, V., MOURY, B. and DAUBEZE, A.M. 1996. A complementation of two genes originating from susceptible *Capsicum annuum* lines confers a new and complete resistance to pepper veinal mottle virus. *Phytopathology*, 86: 739–743.

CARANTA, C., THABUIS, A. and PALLOIX, A. 1999. A. Development of a CAPS marker for the *Pvr4* locus: A tool for pyramiding potyvirus resistance genes in pepper. *Genome*, 42 (6): 1111-1116.

CEBOLLA-CORNEJO, J., SOLER, S., GOMAR, B., SORIA, D.M. and NUEZ, F. 2003. Screening Capsicum germplasm for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV). *Annals of Applied Biology*, 143 (2): 143–152.

CHEN, W., ZHANG, Y., LIU, X., CHEN, B., TU, J. and TINGDONG, F. 2007. Detection of QTL for six yield-related traits in oilseed rape (*Brassica napus*) using DH and immortalized F(2) populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 115: 849–858.

CHO, J.J., MAU, R.F.L., MITCHELL, W.C., GONSALVES, D. and YUDIN L.S. 1987. Host list of plants susceptible to tomato spotted wilt virus (TSWV). 630 US ISSN 0271-9916, Research Extension Series 078.

CHO, J.J., MAU, R.F.L., GERMAN, T.L., HORTMANN, R.W., YUDIN, L.S., GONSALVES, D. and PROVVIDENTI, R. 1989. A multidiciplinar approach to management of tomato spotted wilt virus in Hawaii. *Plant Disease*, 73: 375-383.

CHO, J.J., CUSTER, D.M., BROMMONSCHENKEL, S.H., TANKSLEY, S.D. and KUO, C.G. 1996. Conventional breeding: host plant resistance and the use of molecular markers to develop resistance to tomato spotted wilt virus in vegetables. *Acta Horticulturae*, 431:367-378.

CIUFFO, M., MAUTINO, G.C., BOSCO, L., TURINA, M. and TAVELLA, L. 2010. Identification of Dictyothrips betae as the vector of Polygonum ring spot virus. *Annals of Applied Biology*, 157: 299 –307.

CORTEZ, I., SAAIJER, J., WONGJKAEW, K.S., PEREIRE, A.M., GOLDBACH, R., PETERS, D. and KORMELINK, R. 2001. Identification and characterization of a novel Tospovirus species using a new RT-PCR approach. Arch. Virol., 146: 265-278.

ÇALIŞ, Ö. 2011. Bitki dayanıklılık genleri ve proteinleri. *Türk bilimsel derlemeler dergisi*, 4 (2): 1-9.

ÇANDAR, A. ve ERKAN, S. 2011. Bitkilerde viral etmenlere karsı genetik dayanıklılık mekanizmaları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 9: 13–27.

ÇELİK, İ., ÖZALP, R., ÇELİK, N., POLAT, İ., SÜLÜ, G. ve ÜNLÜ, A. 2013. Patates Y virüsü (Potato Virus Y = PVY)'ne dayanıklı sivri biber hatlarının geliştirilmesi. Derim, 30 (2).

DAUGHTREY, M.L., JONES, R.K., MOYER, J.W., DAUB, M.E. and BAKER, J.R. 1997. Tospoviruses strike the greenhouse industry; INSV has become a major pathogen on flower crops. *Plant Disease*, 81: 1220-1230.

DAUNAY, M.C., JULLIAN, E. and DAUPHIN, F. 2001. Management of eggplant and pepper genetic resources in Europe; networks are emerging. Proceedings of XIth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of *Capsicum* and eggplant. 9-13 Nisan 2001. pp. 1-5, Antalya.

de BORBON, C.M., GRACIA, O. and PI´CCOLO, R. 2006. Relationships between Tospovirus incidence and Thrips populations on tomato in Mendoza, Argentina. *J. Phytopathol*., 154: 93-99.

de RESENDE, O.R., de HAAN, P., dE ÁVILA, A.C., KITAJIMA, E.W., KORMELINK, R., GOLDBACH, R. and PETERS, D. 1991. Generation of envelope and defective interfering RNA mutants of tomato spotted wilt virus by mechanical passage. *J. Gen. Virology*, 72: 2375-2383.

DELİGÖZ, I., SARI, S., ARLI SÖKMEN, M. 2014. First report of resistance breaking strain of Tomato spotted wilt virus (Tospovirus; Bunyaviridae) on resistant sweet pepper cultivars in Turkey. *New Disease Reports*, 30: 26.

DEVI, P.R., DORAISWAMY, S., NAKKEERAN, S., RABINDRAN, R., GANAPATHY, T., RAMIAH, M. and MATHIYAZHAGAN, S. 2004. Antiviral action of Harpulia cupanioides and Mirabilis jalapa against tomato spotted wilt virus (TSWV) infecting tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 37: 245-259.

DEVRAN, Z. 2003. Moleküler işaretleyicilerin dayanıklılık ıslahında kullanılması. *Derim*, 20: 1-6.

ELLIOTT, R. M. 1990. Molecular biology of the Bunyaviridae. *Journal of General Virology,* 71: 501-522.

ESHBAUGH, W.H. 1980. The taxonomy of the genus *Capsicum* (Solanaceae). *Phytologia*, 47: 153-166.

FANIGLIULO, A., COMES, S., PACELLA, R., CRESCENZI, A., MOMOL, M.T., OLSON, S.M. and REITZ, S. 2009. Integrated management of viral diseases in field-grown tomatoes in Southern Italy. *Acta Horticulturae*, 808: 387–391.

FLOOR, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Reviews of Phytopathology*, 9: 275-296.

FRANCKI, R. I. B. 1991. Classification and nomenclature of viruses. Fifth Report of the international committee of taxonomy of viruses. Archives of Virology.

GALBRAITH, D.W., HARKINS, K.R., MADDOX, J.M., AYRES, N.M., SHARMA, D.P. and FIROOZABADY, E. 1983. Rapid flow cytogenic analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, 220: 1049-1051.

GELDERMANN, H. 1975. Investigations on inheritance of quantitative in animals by gene markers. *Theor. Appl. Genet*., 46: 319-330.

GOODMAN, R.N. and NOVACKY, A.J. 1994. The hypersensitive reaction in plants to pathogens. A resistance phenomenon. St. Paul, MN: APS Press.

GOLDBACH, R. and PETERS, D. 1994. Possible causes of the emergence of tospovirus diseases. *Sem. Virology*, 5: 113-120.

GOLDBACH, R., and KUO, G. 1996. Introduction. Proceedings of the international symposium on tospoviruses and thrips of floral and vegetable crops. *Acta Hortic.,* 431: 21-26.

GOVINDAJARAN, V.S., RAJALALSHMI, D. and CHAND, N. 1987. Capsicum production, technology, chemistry and quality. Part IV. Evaluation of quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*., 25: 185–283.

GRACIA, O., DE BORBON, C.M., GRANVAL DE MILLAN, N. and CUESTA, G.V. 1999. Occurence of different Tospovirus in vegetable crops in Argentina. *Journal of Phytopathology*, 147: 223-227.

GRUBE, R.C., BLAUTH, J.R., ARNEDO, M.S., CARANTA, C. and JAHN, M.K. 2000. Identification and comparative mapping of a dominant potyvirus resistance gene cluster in Capsicum. *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 852-859.

GRUBE, R.C., ZHANG, Y.P., MURPHY, J.F., LOAIZA-FIGUEROA, F., LACKNEY, V.K., PROVVIDENTI, R. and JAHN, M.K. 2000. New source of resistance to Cucumber mosaic virus in *Capsicum frutescens*. *Plant Disease*, 84: 885–891.

GUO, D., ZHANG, J., LIU, C., ZHANG, G., LI, M. and ZHANG, Q. 2012. Genetic variability and relationships between and within grape cultivated varieties and wild species based on SRAP markers. *Tree Genetics & Genomes*, 8: 789–800.

GUPTA, P.K., BALYAN, H.S., SHARMA, P.C. and RAMESH, B. 1996. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. *Curr. Sci.,* 70: 45-54.

GÜLDÜR, M.E., MARCHOUX, G., YÜRTMEN, M. ve YILMAZ, M.A. 1995. Mersin ve çevresinde yetiştirilen domateslerde zararlı yeni bir virüs: tomato spotted wilt virus. VII: Turkiye Fitopatoloji Kongresi, 26/29 Eylul, s. 303-305, Adana.

GÜLSEN, O. ve MUTLU, N. 2005. Bitki biliminde kullanılan genetik markırlar ve kullanım alanları. *Alatarım*, 4 (2): 27-37.

HALE, A.L., FARNHAM, M.W., NZARAMBA, M.N. and KIMBENG, C.A. 2007. Heterosis for horticultural traits in broccoli. *Theoretical and Applied Genetics*, 115: 351–360.

HAMMERSCHMIDT, R., 2007. Introduction: definitions and some history. A Sustainable Approach to Crop Protection. Blackwell Publishing, 258 pp, Oxford.

HUANG, J.S. 1985. Mechanisms of resistance to root-knot nematodes. An Advanced treatise on *Meloidogyne*: Volume I. In: Barker KR, Carter CC, Sasser JN, editors. *Biology and control*, pp. 165–174. NC: North Carolina State University Graphics, Raleigh.

HUANG, S.B., ZHANG, B., MILBOURNE, D., CARDLE, L., YANG, G. and Guo, J. 2001. Development of pepper SSR markers from sequence databases. *Euphytica*, 117: 163–167.

HULL, R. 2002. Matthews' Plant Virology. 4th Edition. Academic Press, San Diego, CA.

HOANG, H.N., YANG, B.H. and KANG, C.B. 2013. Identification and inheritance of a new source of resistance against Tomato spotted wilt virüs (TSWV) in Capsicum. *Scientia horticulturae*, 161: 8-14.

HOBBS, H.A., BLACK, L.L., JOHNSON, R.R. and VALVERDE, R.A. 1994. Differences in reactions among tomato spotted wilt virus isolates to three resistant *Capsicum chinense* lines. *Plant Disease*, 78: 1220.

IBPGR International board for plant genetic resources. 1984. Annual report for 1983. Rome, Italy.

IE, T.S. 1970. Tomato Spotted Wilt Virus. C.M.I/A.A.B Description of PlantVirusus, No: 39.

ILBI, H.2002. RAPD markers assisted varietal identification and genetic purity test in pepper, *Capsicum annuum*. *Scientia Horticulturae*, 97: 211-218.

IKTEN, H., ALAGOZ, E. ve IKTEN, C. 2010. Biberde domates lekeli solgunluk virüsü'ne (TSWV) dayanıklılığın moleküler testlemesine yeni bir yaklaşım. 1.Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 26-29 Ekim 2010, ss.85-85, Antalya,

JAHN, M., PARAN, I., HOFFMANN, K., RADWANSKI, E.R., LIVINGSTONE, K.D., GRUBE, R.C., AFTERGOOT, E., LAPIDOT, M. and MOYER, J. 2000. Genetic mapping of the *Tsw* locus for resistance to the tospovirus tomato spotted wilt virus in *Capsicum spp*. and its relationship to the *Sw-5* gene for resistance to the same pathogen in tomato. *The American Phytopathological Society*, 13 (6): 673-682.

JAIN, R.K., S.S., PAPPU, H.R., CULBREATH, A.K. and TOOD, J.W. 1998. Molecular diagnosis of tomato spotted wilt Tospovirüs infection of peanut and other field and greenhouse crops. *Plant Disease*, 82: 900- 904.

JOHNSON, R.R., BLACK, L.L., HOBS, H.A., VALVERDE, R.A., STORY, R.N. and BOND, W.P. 1995. Association of *Frankliniella fusca* and three winter weeds with tomato spotted wilt virus in Louisiana. *Plant Disease*, 79: 572-576.

JONES, A.C. 2004. Using epidemiological information to develop effective integrated virus disease management strategies. *Elsevier*, 100 (1): 5-30.

JONES, R.D. 2005. Plant viruses transmitted by thrips. *European Journal of Plant Pathology*, 113: 119-157.

JORDA, C. and OSCA, J.M.,1991. Un nuevo virus en España, el TSWV. In: Consejería de Agricultura, Industria y Comercio de Extremadura (ed.). Estudios de Fitopatología. Consejería de Agricultura, Industria y Comercio de Extremadura, pp. 35-40, Mérida.

JORDA, C., LACASA, A., COSTA, J., DIEZ, M. J. and NUEZ, F. 1993. Situación actual del TSWV en España. *Hortofruticultura*, 6: 39-42.

JORDA, C., DIEZ, M.J., ROSELLO, S., NUEZ, F., LACALA, A. and COSTA, J. 1994. Biological and serological characterization of TSWV isolates. *Capsicum Newsletter*, 13: 83-85.

KAMBEROĞLU, M.A. and ALAN, B. 2010. Occurrence of tomato spotted wilt virus in lettuce in Cukurova region of Turkey. *International Journal of Agriculture & Biology*, 13: 431-434.

KISHA-KUMAR, N.K., ULLMAN, D.E. and CHO, J.J. 1993. Evaluation of Lycopersicon germplasm for tomato spotted wilt tospovirus resistance by mechanical and thrips transmission. *Plant Disease*, 77 (9): 938-941.

KONIECZYN, A. and AUSUBEL, F.M. 1993. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specifik PCR-based markers. *Plant J.*, 4: 403-410.

KUCUK, A., 2001. Collecting Solanaceae in Turkey. Solanaceae genetic resources in Europe. European Cooperative Programme for Crop Genetic Resources Networks. Nijmegen, pp. 39–43, The Netherlands.

KYLE, M.M. and PALLOIX, A. 1997. Proposed revision of nomenclature for potyvirus resistance genes in *Capsicum*. *Euphytica*, 97: 183–188.

LEE, J.M., NAHM, S.H., KIM, Y.M. and KIM, B.D. 2004. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theoratical Applied Genetic*s, 108: 619- 627.

LEE, J.C., YOO, E., SHIN, H.J., LEE, J., HWANG, H. and KIM, B. 2005. Non-pungent Capsicum contains a deletion in the capsaicinoid synthetase gene, which allows early detection of pungency with SCAR markers. *Mol. Cells*, 19 (2): 262-267.

LEFEBVRE, V., PALLOIX, A., and RIVES, M. 1993. Nuclear RFLP between pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.). *Euphytica*, 71: 189-199.

LEFEBVRE, V., PALLOIX, A., CARANTA, C. and POCHARD, E. 1995. Construction of an intraspesific integrated linkage map of pepper using molecular markers and doubled-haploid progenies. *Genome*, 38: 112-121.

LEFEBVRE, V. and CHEVRE, A. M. 1995. Tools for marking plant disease and pest resistance genes: a review. *Agronomie, EDP Sciences*, 15 (1): 3-19.

LEE, J.M., NAHM, S.H., KIM Y.M. and KIM B.D. 2004. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theor. Appl. Genet.*, 108: 619–627.

LEVI, A., WECHTER, P., MASSEY, L., CARTER, L. and HOPKINS, D. 2011. An genetic linkage map for watermelon based on a testcross and a BC_2F_2 population. *American Journal of Plant Sciences,* 2: 93–110.

LI, G. and QUIROS C.F. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theor. Appl. Genetics*, 103: 455–461.

LI, X.Y., LI, J., ZHAO, Z.J., YANG, F., FU, Q.W., LIU, H.S., WANG, D.D., YANG, Y.C. and WANG, R.Y. 2014. Sequence-related amplıfied polymorphısm (SRAP) for studying genetic diversity and population structure of plants and other living organisms: a protocol. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 24 (5): 1478-1486.

LIN, Z., ZHANG, X., NIE, Y., HE, D. and WU, M. 2003. Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP. *Chinese Science Bulletin*, 48: 2064–2068.

LIN, Z., ZHANG, Y., ZHNAG, X. and GUO, X. 2009. A high-density integrative linkage map for *Gossypium hirsutum. Euphytica*, 166 (1): 35-45.

LIU, Y., YAN, H., YANG, W., LI, X., LI, Y., MENG, Q., ZHANG, L., et al. 2008. Molecular diversity of 23 wheat leaf rust resistance near-isogenic lines determined by sequence-related amplified polymorphism. *Scientia Agricultura Sinica*, 41: 1333–1340.

LITT, M. and LUTY, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.,* 44: 397-401.

LODOS, N. 1982. Türkiye Entomolojisi, Genel Uygulamalı ve Faunistik. Cilt: II, Ege Üniv. Ziraat Fak. Yayınları: 429, Ders Kitabı: 542, İzmir.

LOPEZ, M.M., LLOP, P., OLMOS, A., MARCO-NOALES, E. and CAMBRA, M. et al., 2009. Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? *Molecular Biol*., 11: 13-46.

MANDAL, B., PAPPU, H.R. and CULBREATH, A.K. 2001. Factors affecting mechanical transmission of tomato spotted wilt virus to Peanut (Arachis hypogaea). *Plant Disease*, 85: 1259-1263.

MARCHOUX, G., GEBRE-SELASSIE, K. and VILLEVIEILLE, M. 1991. Detection of tomato spotted wilt virus and transmission by *Frankliniella occidentalis* in France. *Plant Pathology*, 40 (3): 347-351.

MARGARIA, P., CIUFFO, M., and TURINA, M. 2004. Resistance breaking strain of *Tomato spotted wilt virus* (*Tospovirus; Bunyaviridae*) on resistant pepper cultivars in Almeria (Spain). *Plant Pathology,* 53: 795.

MAULE, A.J., CARANTA, C., BOULTON, M.I., 2007. Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. *Molecular Plant Pathology*, 8 (2): 223-231.

MATHER, K. and JINKS, J.L. 1971. Biometrical genetics. Chapman and Hall, 2nd edition, pp. 382, London, UK,

McCOUCH, S.R., CHEN, X., PANAUD, O., TEMNYKH, S., XU, Y., CHO, Y.G., HUANG, N., ISHII, T. and BLAIR, M. 1997. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant molecular biology*, 35 (1-2): 89-99.

MICHELMORE, R.W., PARAN, I. and KESSELI, R.V., 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Prac. Natl. Acad. Sci.,* 88: 9828-9832.

MILBOURNE, D., MEYER, R.C., COLLINS, A.J., RAMSAY, L.D., GEBHARDT, C. and WAUGH, R. 1998. Isolation, characterization and mapping of simple sequnce repeat loci in potato. *Mol. Genetics,* 259: 233- 245.

MIMURA, Y., MINAMIYAMA, Y., SANO, H. and HIRAI, M. 2010. Mapping for axillary shooting, flowering date, primary axis length, and number of leaves in pepper (*Capsicum annuum*). *J. Japan Soc. Hort. Sci*., 79: 56–63.

MINAMIYAMA, Y., KINOSHITA, S., INABA, K. and INOUE, M. 2005. Development of a cleaved amplified sequence (CAPS) marker linked to pungency in pepper. *Plant Breeding*, 124: 288-291.

MINAMIYAMA, Y., TSURO, M. and HIRAI, M. 2006. An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Mol breeding*, 18: 157-169.

MINAMIYAMA, Y., TSURO, M., KUBO, T. and HIRAI, M. 2007. QTL analysis for resistance to Phytophthora capsici in pepper using a high density SSR-based map. *Breeding Science,* 57: 129–134.

MOMOL, M.T., OLSON, S.M., FUNDERBURK, J.E. and STAVISKY, J. 2004. Integrated management of tomato spotted wilt on field-grown tomatoes. *Plant Disease*, 88: 882–890.

MONMA, S. and SAKATA, Y. 1997. Screening of Capsicum accessions for resistance to cucumber mosaic virus. *Japanese Society for Horticultural Science*, 65: 769–776.

MORIONES, E., ARAMBURU, J., RIUDAVETS, J., ARNO, J. and LAVIÑA, A. 1998. Effect of plant age at time of infection by tomato spotted wilt tospovirus on the yield of fieldgrown tomato. *Eu. J. Plant. Pathol*., 104: 295-300.

MORSE, J.G. and HODDLE, M.S. 2006. Invasion biology of thrips. *Annual Reviews of Entomology,* 51: 67-89.

MOUND, L.A. 2001. Thysanoptera (Thrips) of the world—a checklist. CSIRO Publishing, Canberra, Australia.

MOURY, B., PALLOIX, A., GEBRE SELASSIE, K., and MARCHOUX, G. 1997. Hypersensitive resistance to tomato spotted wilt virus in three *Capsicum chinense* accessions is controlled by a single gene and is overcome by virulent strains. *Euphytica*, 94: 45–52.

MOURY, B., SELASSIE, G.K., MARCHOUX, G., DAUBEZE, A.M. and PALLOIX, A. 1998. High temperature effects on hypersensitive resistance to Tomato Spotted Wilt Virus *Tospovirus* (TSWV) in pepper (*C. chinense* Jacq.). *European Journal of Plant Pathology*, 104: 489-498.

MOURY, B., PFLIEGER, S., BLATTES, A., LEFEBVRE, V. and PALLOIX, A. 2000. A CAPS marker to assist selection of tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance in pepper. *Genome,* 43 (1): 137–142.

MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. and ERLICH, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold spring Harb. Symp. *Quant. Biol*., 51 (1): 263-73.

MURAKAMI, K., IDO, M. and MASUDA, M. 2006. Fruit pungency of 'Shishito' pepper as affected by a dark interval in continuous fluorescent illumination with temperature alteration. *J. Sci. High Tech. Agr*., 18: 284-289.

MUTLU, N., BOYACI, F.H., GOCMEN, M. and ABAK, K. 2008. Development of SRAP, SRAP-RGA, RAPD and SCAR markers linked with a Fusarium wilt resistance gene in eggplant. *Theor. Appl. Genet*., 117 (8): 1303-1312.

NAGY, I., STAGEL, A., SASVARI, Z., RODER, M. and GANAL, M. 2007. Development, characterization, and transferability to other Solanaceae of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genome*, 50: 668–688.

NUEZ,F., DİEZ, M.J., ROSELLO, S., LACASA, A., JORDA, C., MARTİN, M. and COSTA, J. Genetic resistance to tswv (tomato spotted wilt virus) in *Capsicum spp*. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, 13: 82-84.

NUNOME, T., SUWABE, K., IKETANI, H., HIRAI, M. and WRICKE, G. 2003. Identification and characterization of microsatellites in eggplant. *Plant Breeding*, 122 (3): 256-262.

OHNISHI, J., KATSUZAKI, H., TSUDA, S., SAKURAI, T., AKUTSU, K. and MURAI, T. 2006. *Frankliniella cephalica*, a new vector for *Tomato spotted wilt virus*. *Plant Disease*, 90: 685.

PALLOIX, A., DAUBEZE, A.M. and POCHARD, E. 2003. Le Piment. In: Pitrat M, Foury C. (eds). Historie de legumes: Des origines al oree du XXle siecle. Edition INRA, pp. 278-290, Paris, France.

PARAN, I., AFTERGOOT, E. and SHIFRISS, C. 1998. Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. *Euphytica*, 99: 167-177.

PAPPU, R.H., JONES, R.A.C. and JAIN, R.K. 2009. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. *Virus Research*, 141 (2): 219-236.

PARRELLA, G., GOGNALONS, P., GEBRE-SELASSIE, K., VOVLAS, C. And MARCHOUX, G. 2003. An update of the host range of Tomato spotted wilt virus. *Journal of Plant Pathology*, 85 (4): 227-264.

PASKO, P., LUIS ARTEAGA, M. and GIL ORTEGA, R. 1992. Different kinds of reactions to PVY-1-2 in *Capsicum annuum* L. cv 'SCM-334'. Proc 8th Eucarpia Meet. Genet. Breed., pp. 153–156, *Capsicum* Eggplant.

PINAR, H., ATA, A., KELEŞ, D., MUTLU, N., DENLİ, N. and ÜNLÜ, M. 2013. Domates hatlarında Fusarium *oxysporum* f. sp. *lycopersici'*ye dayanıklılığın moleküler markörler yardımıyla belirlenmesi. *Derim,* 30 (1): 15-23.

PINAR, H., ATA, A., KELEŞ, D., MUTLU, N. ve ÜNLÜ, M. 2013. Domateste bazı hastalık ve zararlılara dayanıklı hat ve çeşit geliştirmede moleküler markörlerin kullanımı. *Alatarım,* 12 (1): 10-18.

PICKERSGILL, B. 1997. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica*, 96: 129-133.

PITTMAN, H.A. 1927. Spotted wilt of tomatoes. Journal of the Australian Council for Scientific and Industrial Research, 1: 74–7.

PREMACHANDRA, W.T.S.D., BORGEMEISTER, C.C., MAISS, E., KNIERIM, D. and PORHLING, H.M. 2005. *Ceratothripoides claratris*, a new vector of tospovirus infecting tomatoes in Thailand. *Phytopathology*, 95*:* 659–663.

POWELL, W., MORGANTE, M., ANDRE, C., HANAFEY, M., VOGEL, J., TINGEY, S. and RAFALSKI, A. 1996a. The Comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2: 225–38.

RAST, A.T.B. 1988. Pepper tobamoviruses and pathotypes used in resistance breeding. *Capsicum Newsletter*, 7: 20–23.

REITZ, S.R., YEARBY, E.L., FUNDERBURK, J.E., STAVISKY, J., MOMOL, M.T. and OLSON, S.M. 2003. Integrated management tactics for *Frankliniella* thrips (Thysanoptera: Thripidae) in field-grown pepper. *J. Econ. Entomology,* 96 (4): 1201-14.

RICE, D., GERMAN, T.L., MAU. R.F.L. and FUJIMOTO, F.M. 1990. Dot blot detection of tomato spotted wilt virus RNA in plant and thrips tissues by cDNA clones. *Plant Disease*, 74: 274-276.

RILEY, D.G. and PAPPU, H.R. 2000. Evaluation of tactics for management of thrips-vectored tomato spotted wilt tospovirus in tomato. *Plant Disease*, 84: 847-852.

RILEY, D.G. and PAPPU, H.R. 2004. Tactics for management of thrips (Thysanoptera, Thripidae) and Tomato spotted wilt virus in tomato. *Journal of Economic Entomology*, 97: 1648-1658.

RODRIGEZ- MAZA,M.J., GARCES-CLAVER, A., PARK, S:W., KANG, B.C. and ARNEDO- ANDRES, M.S.2012. A versatile PCR marker for pungency in *Capsicum* spp. Molecular Breeding, 30 (2): 889-898.

ROGGERO, P., LISA, V., NERVO, G. and PENNAZIO, S. 1996. Continuous high temperature can break the hypersensitivity of *Capsicum chinense* 'PI152225' to tomato spotted wilt tospovirus (TSWV). *Phytopathologia Mediterranea*, 35: 117-120.

ROGGERO, P., MELANI, V., CIUFFO, M., TAVELLA, L., TEDESCHI, R. and STRAVATO, V. M. 1999. Two field isolates of tomato spotted wilt tospovirus overcome the hypersensitive response of a pepper (*Capsicum annuum*) hybrid with resistance introgressed from *C. chinense* "PI152225". *Plant Dis.*, 83:965.

ROSELLO, S., DIEZ, M.J., LACASA, A., JORDA, C. and NUEZ, F. 1996. Testing resistance to TSWV introgressed from Lycopersicon peruvianum by artificial transmission techniques. *Euphytica*, 98: 93-98.

RUIZ, J.J., GARCIA-MARTINEZ, S., PICO, B., GAO, M.Q. and QUIROS, C.F. 2005. Genetic variability and relationship of closely related Spanish traditional cultivars of tomato as detected by SRAP and SSR markers. *American Society For Horticultural Science Journal*, 130 (1): 88-94.

SAIDI, M. and WARADE, S.D. 2008. Tomato breeding for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) : an overview of conventional and molecular approaches. *Genetics and Plant Breeding*, 44 (3): 83-92.

SAKIMURA, K. 1963. *Frankliniella fusca*, an additional vector for the tomato spotted wilt virus, with notes on Thrips tabaci, another vector. *Phytopathology*, 53: 412-415.

SAMPSON, P.J. and WALKER, J. 1982. An annotated list of plant diseases in Tasmania. Hobart, Australia: Department of Agriculture, Tasmania.

SAMUEL, G., BALD, J.G. and PITTMAN, H.A. 1930. Investigations on 'spotted wilt' of tomatoes. *Australian Council of Science and Industrial Research Bullet in*, 44: 64.

SITHIWONG, K., MATSUI, T., and SUKPRAKARN, S. 2005. Classification of pepper (*Capsicum annuum* L.) accesions by RAPD analysis. *Biotechnology*, 4 (4): 305-309.

SMULDER, J.M.J., BREDEMEIJER, G., RUS-KORTEKAAS, W., ARENS, P. and VOSMAN, B. 1997. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphism among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accesions of other Lycopersicon species. *Theoretical and Applied Genetics*, 94 (2): 264-272.

SOLER, S., DIEZ, M.J. and NUEZ, F. 1998. Effect of temperature regime and growth stage interaction on pattern of virus presence in TSWV-resistant accessions of *Capsicum chinense*. *Plant Disease*, 82: 1199-1204.

SUZUKI, K., KURADO, T., MIURA, Y. and MURAI, J. 2003. Screening and field trials of virus resistant sources in *Capsicum spp*. *Plant Disease*, 87: 779–783.

STASKAWICZ, B., AUSUBEL, F.M., BAKER, B.J., ELLIS, J.G. and JONES, J.D.G. 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, 268: 661-667.

STEVENS, M.R., SCOTT, S.J., and GERGERICH, R.C. 1992. Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon esculentum* Mill. *Euphytica*, 59: 9–17.

ŞENER, E. ve ŞAHİN, S. 2010. Kapsaisin: farmakokinetik, toksikolojik ve farmakolojik özellikleri. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 29 (2): 149-163.

ŞEVİK, M.A. ve ARLI-SÖKMEN, M. 2007. Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV)' nün trips türleri (Thrips tabaci Lindeman ve Frankliniella intonsa Trybom) ile yayılış durumunun incelenmesi. Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 27-30 Ağustos 2007, ss. 115, Antalya.

ŞEVİK, M.A. ve KÖSE-TOHUMCU, E. 2010. Camgüzeli nekrotik leke virüsü (Impatiens necrotic spot tospovirus; INSV): özellikleri, konukçuları, belirtisi, yayılışı, coğrafi dağılımı ve mücadelesi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 3 (1): 29-34.

ŞEVİK, M.A. 2011. Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV)' nün tarımsal ürünlerde meydana getirdiği ekonomik kayıplar. *Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 15 (1): 35-42.

TANKSLEY, S. 1984. Linkage relationships and chromosomal locations of enzyme coding genes in pepper, *Capsicum annuum*. *Chromosoma*, 89: 352-360.

TANKSLEY, S.D., BERNATZKY, R., LAPITAN, N.L. and PRINCE, J.P. 1988. Conservation of gene repertoire but not gene order in pepper and tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 6419-6423.

TANKSLEY, S.D., YOUNG, N.D., PATERSON, A.H. and BONIERBALE, M.W. 1989. RFLP mapping in plant breeding, new tools for an old science. *Biotechnology*, 7: 257-264.

TAUTZ, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research*, 17: 463 – 471.

TEKİNEL, N., DOLAR, M.S., SAĞSÖZ, S. ve SALCAN, Y. 1969. Mersin Bölgesinde ekonomik bakımdan önemli bazı sebzelerin virüsleri üzerinde araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 9 (1): 37-49.

THIEL, T., MICHALEK, W., VARSHNEY, R.K. and GRANER, A. 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genetics*, 106: 411-422.

THOMAS-CARROL, M.L. and JONES, R.A.C. 2003. Selection, biological properties and fitness of resistance-breaking strains of tomato spotted wilt virus in pepper. *Ann. Appl. Biol*., 142:235-243.

TRUONG, H.T.H., KIM, T., KIM, S., KIM, H., CHO, M.C. and WOO, J.G. 2009. Development of gene- based markers fort the *Pun1* pungency gene in pepper (*Capsicum spp*.) for marker- assisted selection. *Hort. Environ. Biotechnology*, 50 (4): 358-365.

TUNÇ, İ. 1985. On some Thysanoptera from the Middle Black Sea Region of Turkey. *Türk. Bitki Koruma Dergisi,* 9: 217-224.

TUNÇ, İ. ve GÖÇMEN, H. 1995. Antalya'da bulunan iki sera zararlısı *Polyphagotarlatus* (Banks) (Acarina, Tarsonemidae) ve *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera, Thripidae) üzerine notlar. *Türk Entomol. Der*., 19: 101-109.

VAIRA, A.M., ROGGERO, P., LUISONI, E., MASENGA, V., MILNE, R.G. and LISA, V. 1993. Characterization of two tospoviruses in İtaly: tomato spotted wilt virus and impatiens necrotic spot virus. *Plant path*. 42: 530.

WALSH, B.M. and HOOT, S.B. 2001. Phylogenetic relationships of *Capsicum* (*Solanaceae*) using DNA sequences from two noncoding regions: the chloroplast atpB-rbcL spacer region and nuclear waxy introns. *Int. J. Plant Science*, 162: 1409-1418.

WHITFIELD, A.E., ULLMAN, D.E. and GERMAN, T.L. 2005. Tospovirus–thrips interactions. *Annu. Rev. Phytopathol*, 43: 459–489.

UHRIG, J.F., SOELLICK, T.R., MINKE, C.J., PHILIPP, C., KELLMAN, J.W. and SCHREIER, P.H. 1999. Homotypic interaction and multimerization of nucleocapsid protein of Tomato spotted wilt tospovirus: Identification and characterization of two interacting domains. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 96: 55-60.

ULLMAN, D.E., CHO, J.J., MAU, R.F.L., HUNTER, W.B., WESTCOTT, D.M. and CUSTER D.M. 1992. Thrips–tomato spotted wilt virüs interaction: morphological, behavioral and cellular components in fluencing thrips transmission. *Advances in Disease Vector Research*, 9: 195–240.

ULLMAN, D.E., SHERWOOD, J.L., and GERMAN, T.L. 1997. Thrips as vectors of plant pathogens. In: Lewis, T, ed. Thrips as Crop Pests. CAB International, pp. 539-565, Newyork.

UZUN, A., YESILOGLU, T., AKA-KACAR, Y., TUZCU, O. and GULSEN, O. 2009. Genetic diversity and relationships within *Citrus* and related genera based on sequence related amplified polymorphism markers (SRAPs). *Scientia Horticulturae*, 121: 306–312.

VARMA, A. 1993. Integrated management of plant viral diseases. *Ciba Found Symp*., 177: 140-55.

VURAL, H., EŞİYOK, D. ve DUMAN, İ. 2000. Kültür sebzeleri (Sebze yetiştirme). Ege Üniversitesi Basım Evi, Bornova, İzmir.

ZHANG, Z., HU, M., ZHANG, J., LIU, D., ZHENG, J., ZHANG, K., WANG, W. and WAN, Q. 2009. Construction of a comprehensive PCR-based marker linkage map and QTL mapping for fiber quality traits in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Molecular Breeding*, 24: 49–61.

WIJKAMP, I., VAN LENT, J., KORMELINK, R., GOLDBACH, R. and PETERS, D. 1993. Multiplication of tomato spotted wilt virus in its vector Frankliniella *occidentalis*. *J. Gen. Virol*., 74: 341-349.

XU, X., ZENG, L., LI, Y. and WANG, H. 2014. Inheritance of resistance to *Phythophtora* in *Capsicum annuum* and analysis of relative srap markers. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6 (6): 1967-1972.

YARDIMCI, N., and KILIC, H.C. 2009. Tomato spotted wilt virus in vegetable growing areas in the west mediterranean region of Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 8 (18): 4539-4541.

YEBOAH, M.A., CHEN, X., FENG, C., LIANG, G. and GU, M. 2007. A genetic linkage map of cucumber (*Cucumis sativus* L.) combining SRAP and ISSR markers. *African Journal of Biotechnology*, 6: 2784–2791.

YI, G., LEE, J.M., LEE, S., CHOI, D. and KIM, B.D. 2006. Exploitation of pepper EST-SSRs and an SSR-based linkage map. *Theor. Appl.Genet.*, 114: 113–130.

YI, Y.J., LIU, H.Y., HUANG, X.Q., AN, L.Z., WANG, F., and WANG, X.L. 2007. Development of molecular markers linked to the wheat powdery mildew resistance gene *Pm4b* and marker validation for molecular breeding. *Plant Breeding*, 127 (2): 116-120.

YOL, E. 2015. Yerfıstığı (*arachis hypogaea* l.) germplasmında bazı hastalık ve zararlılara dayanıklılık genlerinin moleküler markerlerle belirlenmesi ve moleküler ıslah yardımıyla ileri hat ve çeşitlere aktarılması. Doktora tezi, Akdeniz Üniversitesi, ss. 124, Antalya.

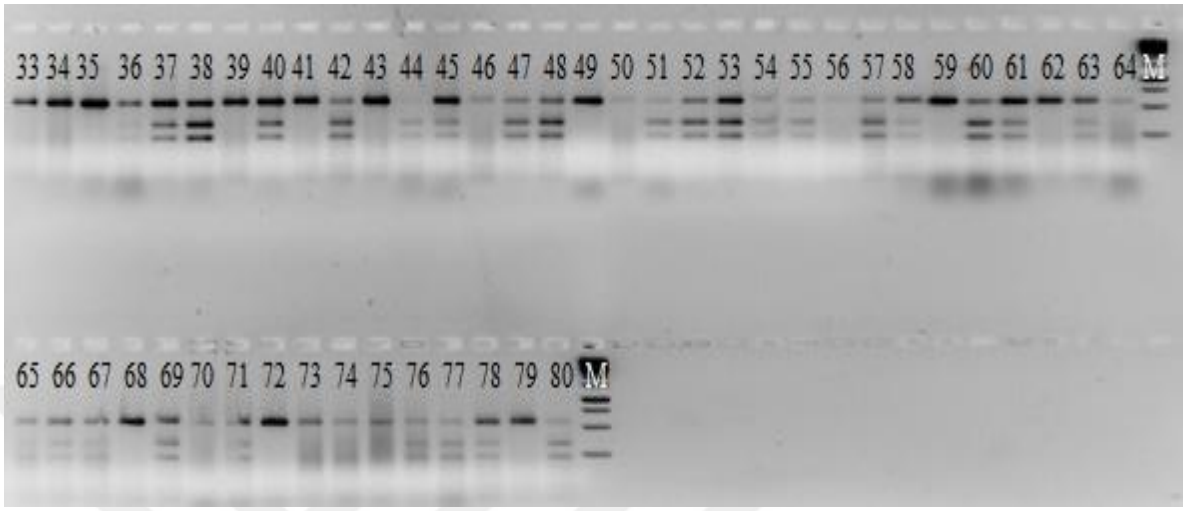
YU, K., PARK, S.J. and POYSA, V. 2000. Marker-assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: efficacy and economics. *Plant Breeding*, 119: 411-415.

YUAN, X., LI, J., PAN, G., WANG, S., JIANG, X., LI, S., DENG, H., et al. 2008. Genetic linkage map construction and location of QTLs for fruit-related traits in cucumber. *Plant Breeding*, 127: 180–188.

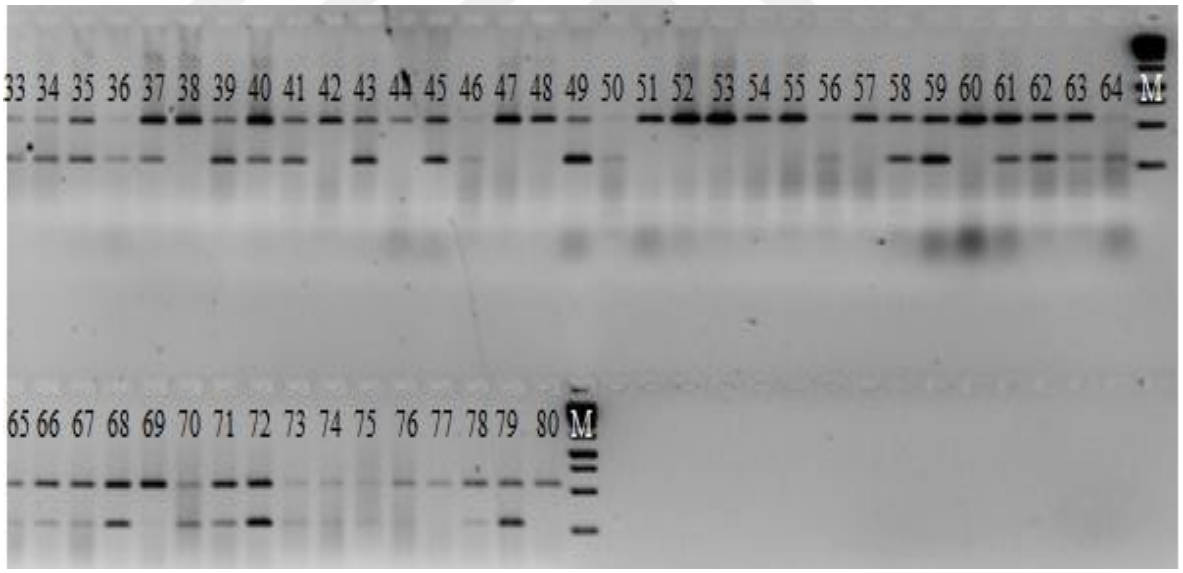
YURTMEN, M., GULDUR, M.E. and YILMAZ, M.A. 1999. Tomato spotted wilt virus on peppers in İçel province of Turkey. *Petria*, 9 (3): 243-344.

8. EKLER

EK 1. P1 33-80 numaralı örneklerin Xba ve TaqI enzimleri ile kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü



33-80 nolu örneklerin TaqI enzimi ile kesim ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü



33-80 nolu örneklerin TaqI enzimi ile kesim ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü

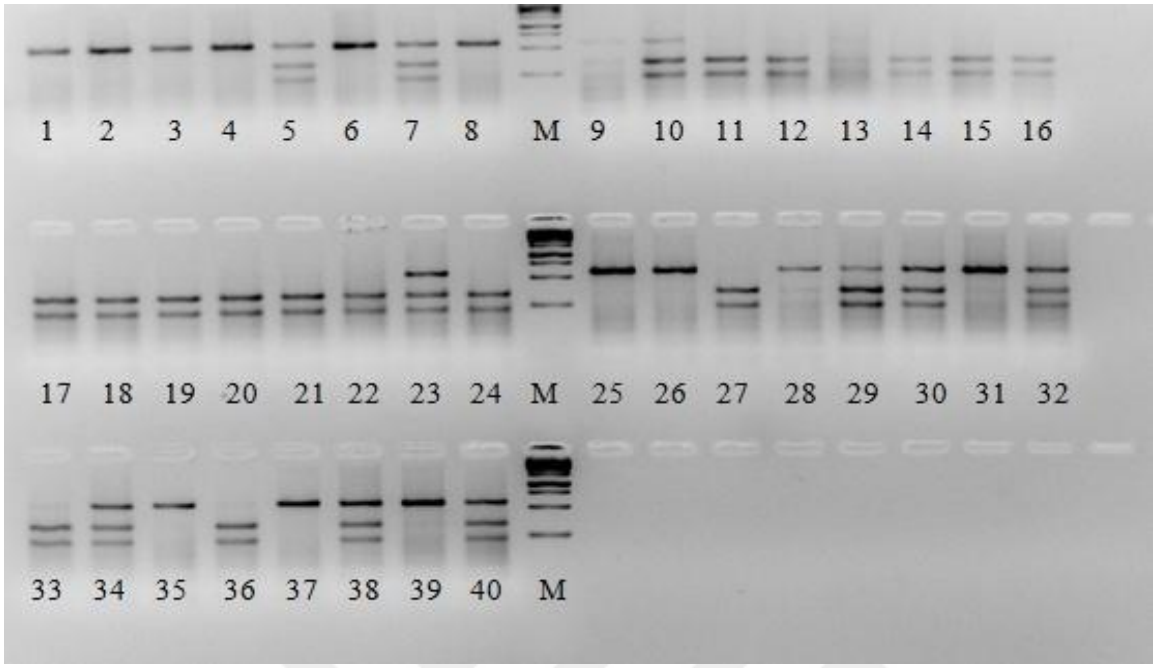
EK 2. P1 96 örnek Hpmse031 primeri PCR amplifikasyon ürünleri agaroz jel görüntüsü



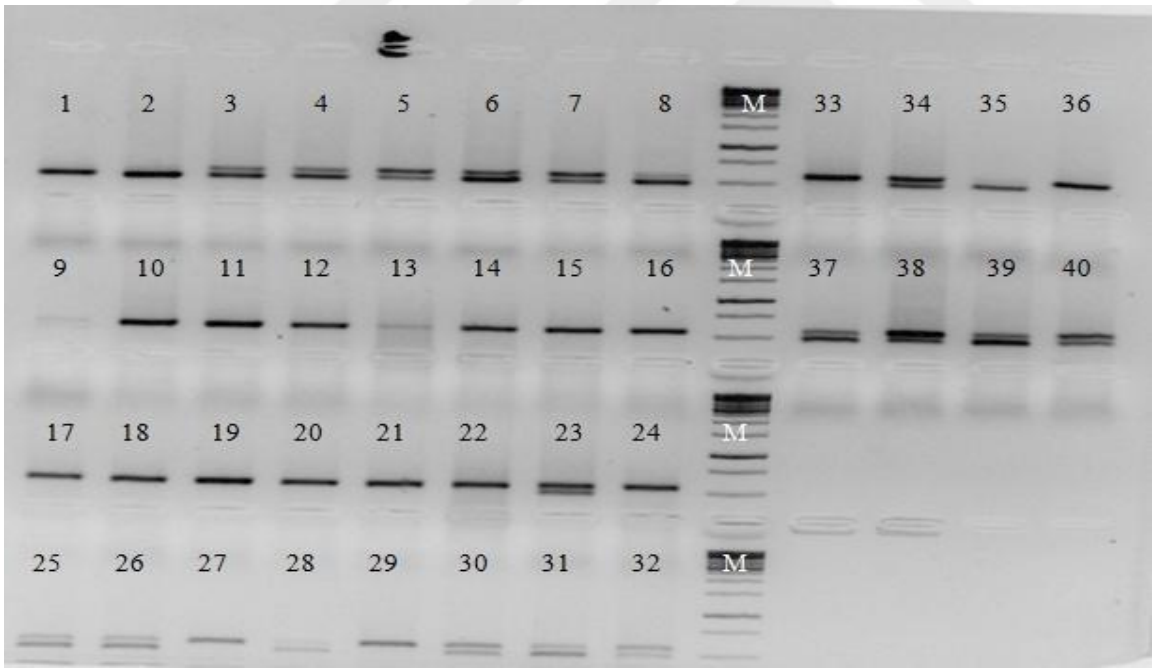
EK 3. P1 96 örnek SCAC568 ve Hpmse031 markırlarından elde edilen moleküler sonuçlar

örnek	SCAC568	Hpmse031	örnek	SCAC568	Hpmse031
1	Rr	Rr	**49**	RR	RR
2	rr	rr	**50**	Rr	Rr
3	rr	Rr	**51**	rr	rr
4	RR	RR	**52**	rr	rr
5	Rr	RR	**53**	rr	rr
6	RR	RR	**54**	rr	rr
7	RR	RR	**55**	rr	rr
8	RR	RR	**56**	Rr	Rr
9	Rr	Rr	**57**	rr	Rr
10	RR	RR	**58**	rr	Rr
11	RR	Rr	**59**	RR	RR
12	Rr	Rr	**60**	rr	rr
13	rr	rr	**61**	Rr	Rr
14	rr	rr	**62**	RR	RR
15	rr	rr	**63**	Rr	Rr
16	Rr	Rr	**64**	Rr	Rr
17	Rr	Rr	**65**	Rr	rr
18	RR	RR	**66**	Rr	Rr
19	RR	RR	**67**	Rr	Rr
20	rr	rr	**68**	RR	RR
21	Rr	Rr	**69**	rr	rr
22	rr	rr	**70**	RR	RR
23	RR	RR	**71**	Rr	Rr
24	Rr	Rr	**72**	RR	RR
25	RR	RR	**73**	RR	RR
26	Rr	Rr	**74**	Rr	Rr
27	Rr	Rr	**75**	RR	RR
28	rr	rr	**76**	rr	rr
29	rr	rr	**77**	rr	rr
30	RR	Rr	**78**	Rr	Rr
31	Rr	Rr	**79**	RR	RR
32	Rr	Rr	**80**	rr	rr
33	Rr	Rr	**81**	rr	rr
34	RR	Rr	**82**	Rr	Rr
35	RR	RR	**83**	rr	rr
36	Rr	Rr	**84**	rr	Rr
37	Rr	Rr	**85**	RR	RR
38	rr	rr	**86**	RR	RR
39	RR	RR	**87**	rr	Rr
40	Rr	Rr	**88**	RR	RR
41	Rr	Rr	**89**	RR	RR
42	rr	rr	**90**	Rr	Rr
43	RR	RR	**91**	RR	RR
44	rr	rr	**92**	rr	rr
45	Rr	Rr	**93**	RR	RR
46	Rr	Rr	**94**	RR	RR
47	rr	rr	**95**	Rr	Rr
48	rr	rr	**96**	Rr	Rr

EK 4. P2 40 örnek Xba ve TaqI enzimleri ile kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

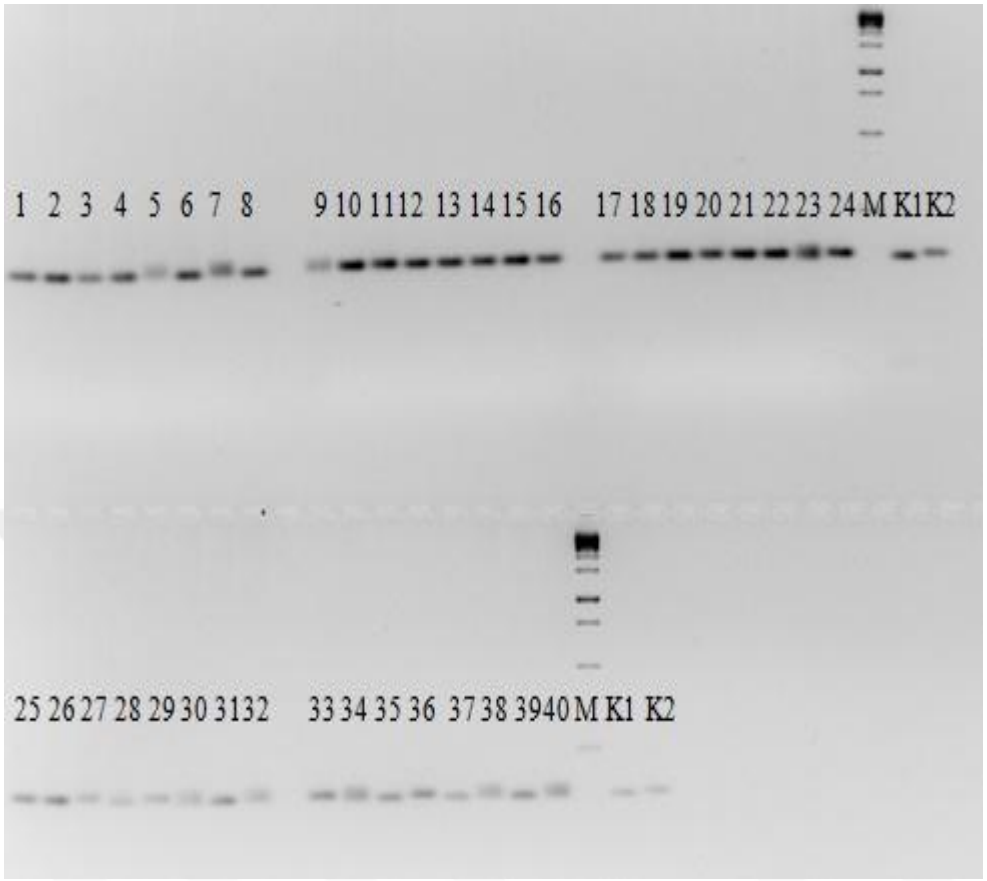


TaqI enzimi ile kesim ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü



Xba enzimi ile kesim ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü

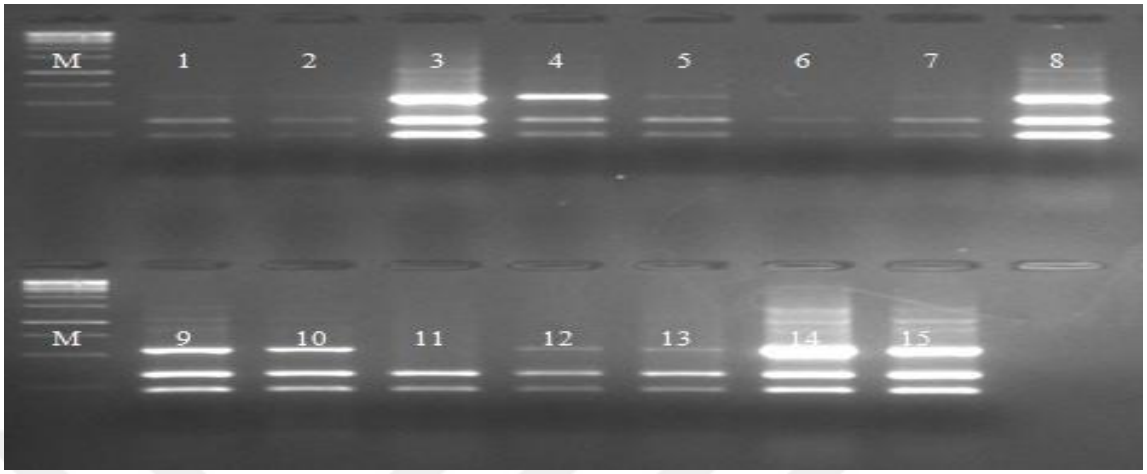
EK 5. P2 40 örnek Hpmse031 primeri PCR amplifikasyon ürünleri agaroz jel görüntüsü



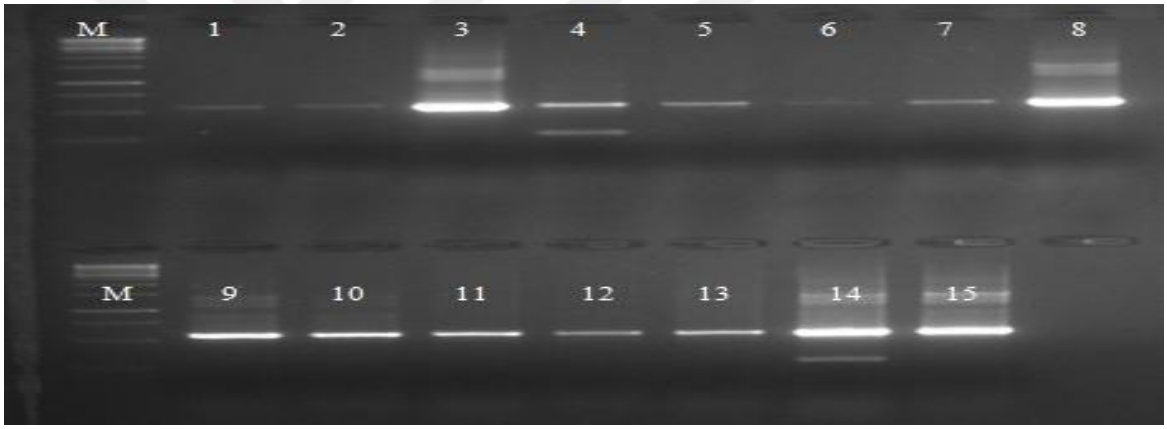
EK 6. P2 40 örnek SCAC568 ve Hpmse031 markırlarından elde edilen sonuçların moleküler karakterizasyonu

örnek	SCAC568	Hpmse031	örnek	SCAC568	Hpmse031
1	RR	RR	**21**	rr	rr
2	RR	RR	**22**	rr	rr
3	RR	RR	**23**	Rr	Rr
4	RR	RR	**24**	rr	rr
5	Rr	Rr	**25**	RR	RR
6	RR	RR	**26**	RR	RR
7	Rr	Rr	**27**	rr	rr
8	RR	RR	**28**	Rr	rr
9	rr	rr	**29**	rr	rr
10	rr	rr	**30**	Rr	Rr
11	rr	rr	**31**	RR	RR
12	rr	rr	**32**	Rr	Rr
13	rr	rr	**33**	rr	rr
14	rr	rr	**34**	rr	Rr
15	rr	rr	**35**	RR	RR
16	rr	rr	**36**	rr	rr
17	rr	rr	**37**	RR	RR
18	rr	rr	**38**	Rr	Rr
19	rr	rr	**38**	RR	RR
20	rr	rr	**40**	Rr	Rr

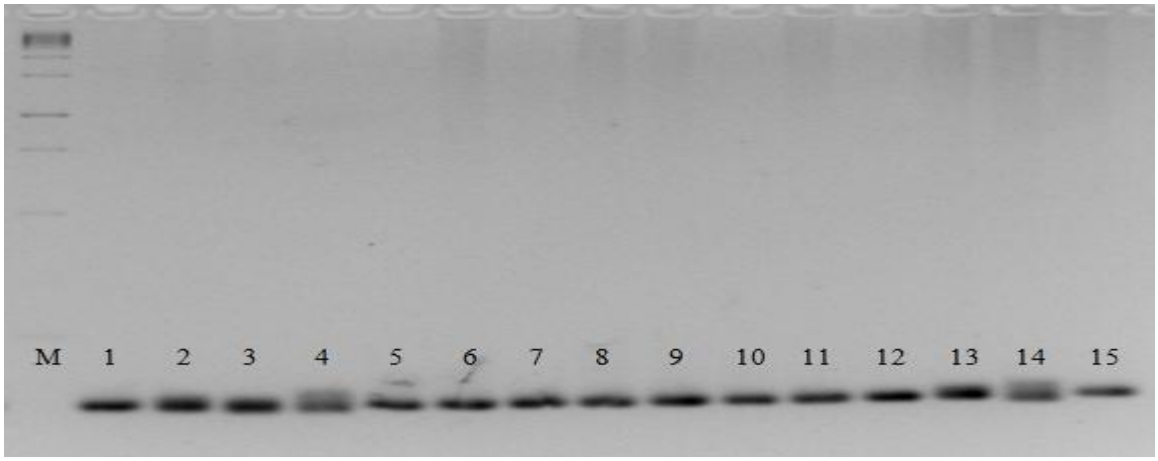
EK 7. P3 15 örnek, Xba ve TaqI enzimleri ile kesim ürünlerinin ve Hpmse031 primeri PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel görüntüleri



TaqI enzimi ile kesim ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü



Xba enzimi ile kesim ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü

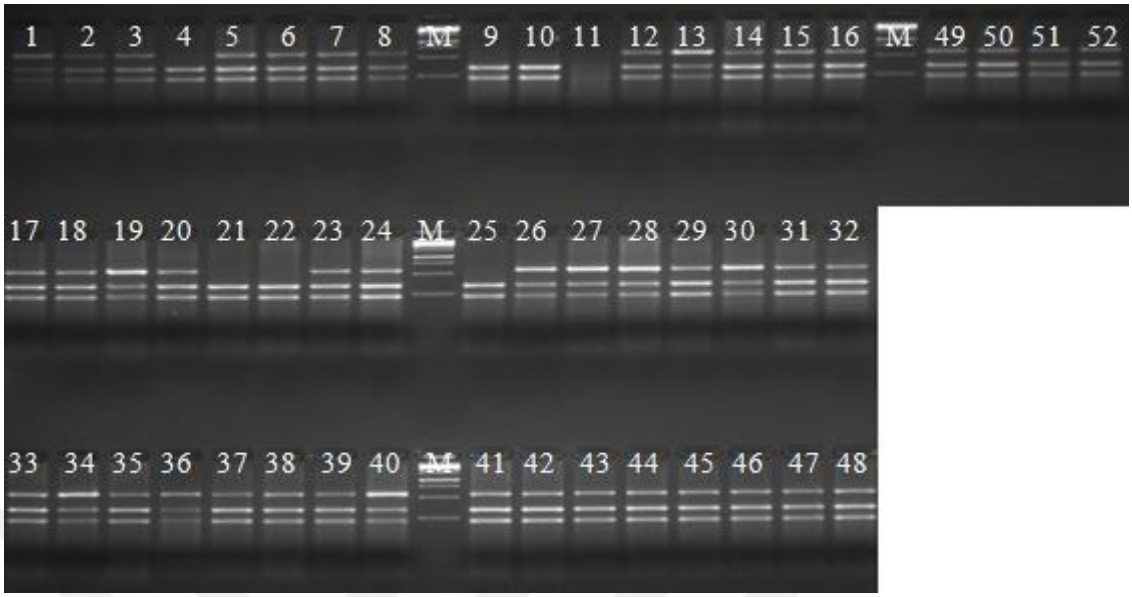


Hpmse031 primeri PCR amplifikasyon ürünleri agaroz jel görüntüsü

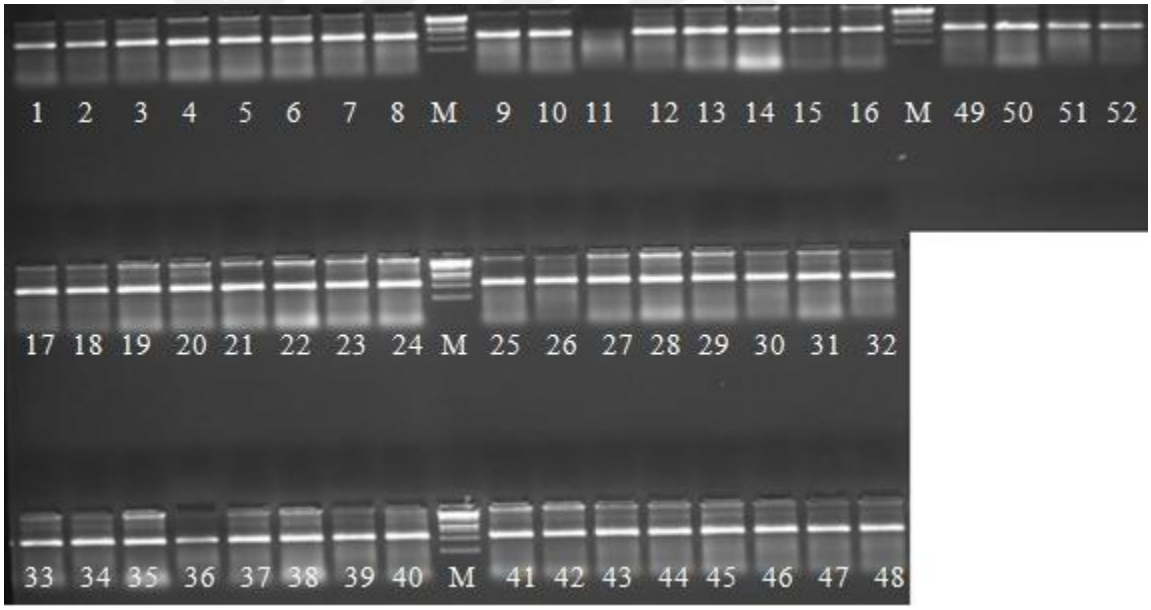
EK 8. P3 15 örnek SCAC568 ve Hpmse031 markırlarından elde edilen sonuçların moleküler karakterizasyonu

örnek	SCAC568	Hpmse031
1	rr	rr
2	rr	rr
3	rr	rr
4	Rr	Rr
5	rr	rr
6	rr	rr
7	rr	rr
8	rr	rr
9	rr	rr
10	rr	rr
11	rr	rr
12	rr	rr
13	rr	rr
14	Rr	Rr
15	rr	rr

EK 9. P4 52 örnek Xba ve TaqI enzimleri ile kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

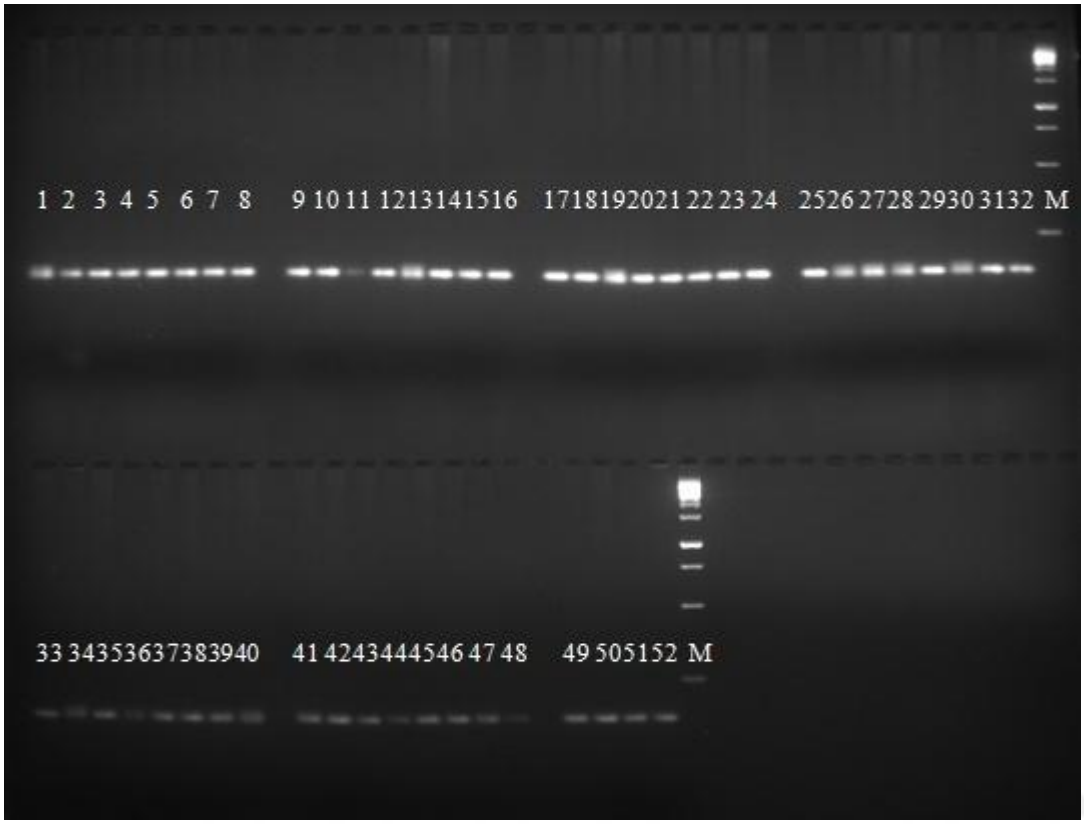


TaqI enzimi ile kesim ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü



Xba enzimi ile kesim ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü

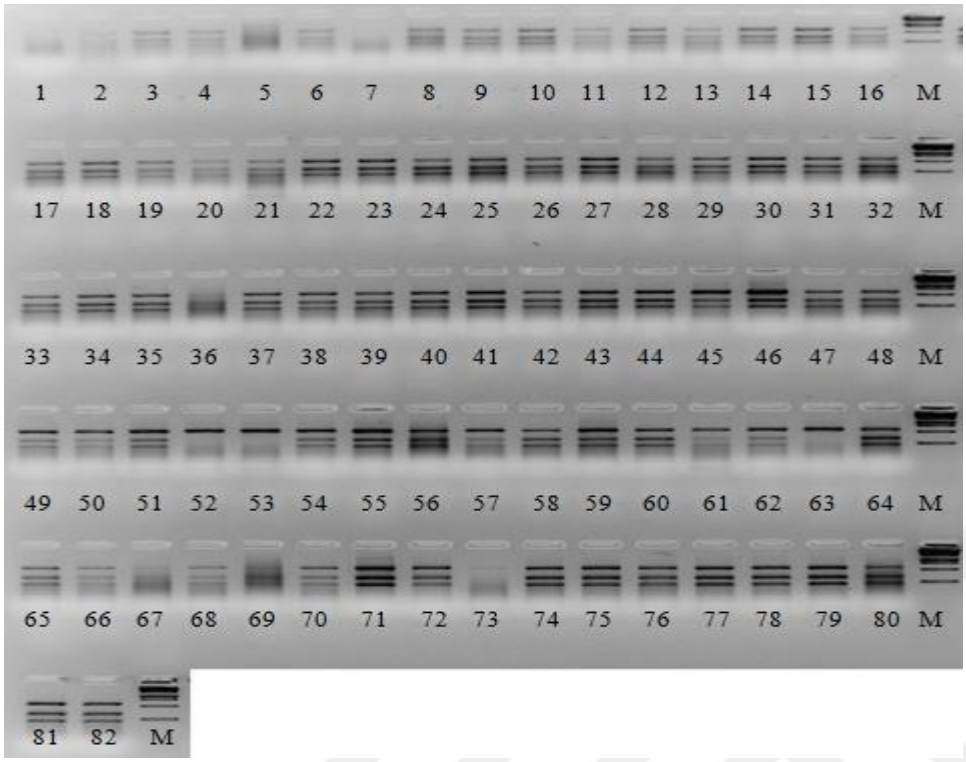
EK 10. P4 52 örnek Hpmse031 primeri PCR amplifikasyon ürünleri agaroz jel görüntüsü



EK 11. P4 52 örnek SCAC568 ve Hpmse031 markırlarından elde edilen sonuçların moleküler karakterizasyonu

örnek	SCAC568	Hpmse031	örnek	SCAC568	Hpmse031
1	Rr	Rr	**27**	rr	Rr
2	rr	rr	**28**	Rr	Rr
3	rr	rr	**29**	rr	rr
4	rr	rr	**30**	rr	Rr
5	rr	rr	**31**	rr	rr
6	rr	rr	**32**	rr	rr
7	rr	rr	**33**	rr	rr
8	rr	rr	**34**	Rr	Rr
9	rr	rr	**35**	rr	rr
10	rr	rr	**36**	Rr?	Rr
11	rr	rr	**37**	rr	rr
12	rr	rr	**38**	rr	rr
13	Rr	Rr	**39**	rr	rr
14	rr	rr	**40**	Rr	Rr
15	rr	rr	**41**	rr	rr
16	rr	rr	**42**	rr	rr
17	rr	rr	**43**	rr	rr
18	rr	rr	**44**	rr	rr
19	Rr	Rr	**45**	rr	rr
20	rr	rr	**46**	rr	rr
21	rr	rr	**47**	rr	rr
22	rr	rr	**48**	rr	rr
23	rr	rr	**49**	rr	rr
24	rr	rr	**50**	rr	rr
25	rr	rr	**51**	rr	rr
26	Rr	Rr	**52**	rr	rr

EK 13. P5 82 örnek Xba ve TaqI enzimleri ile kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

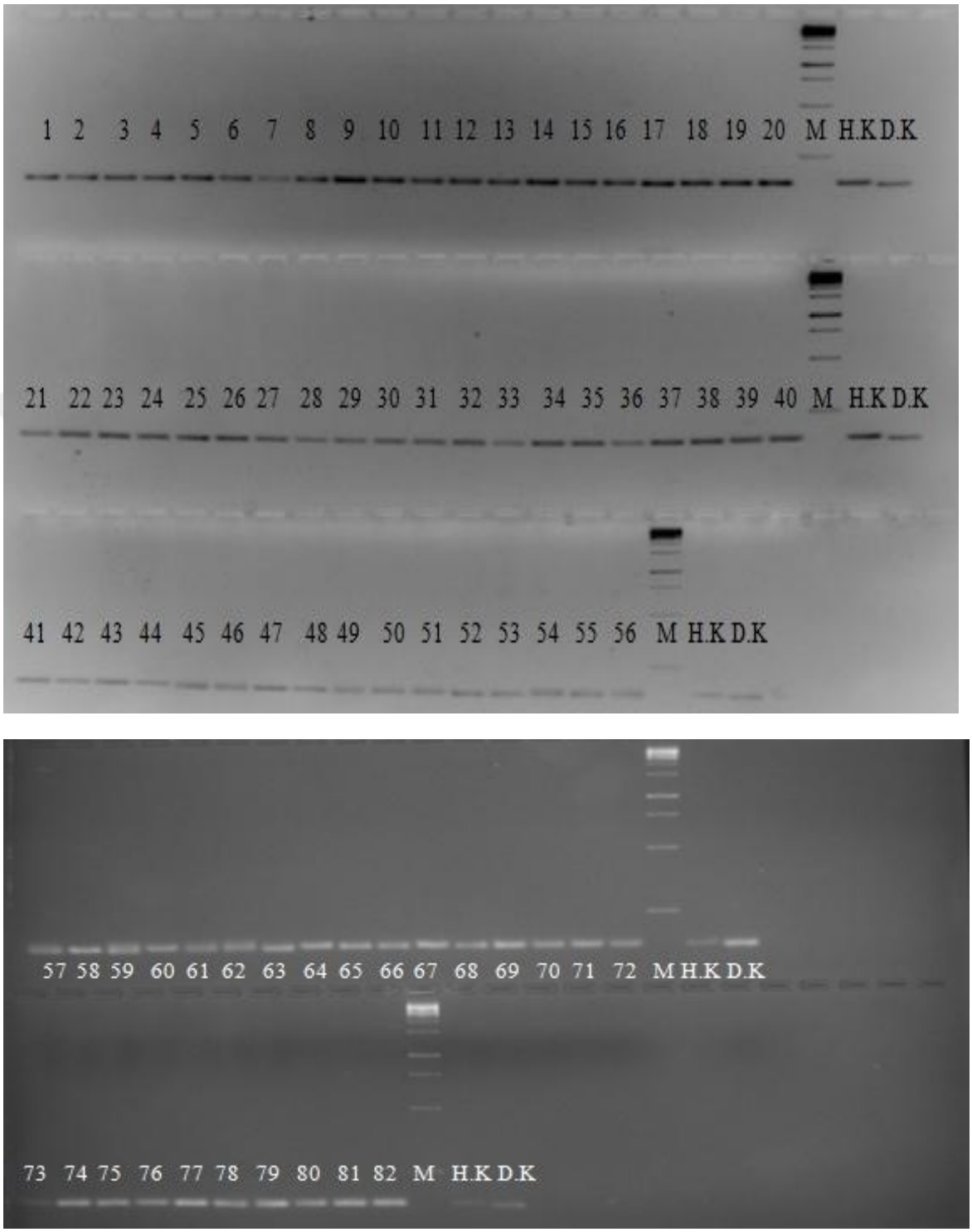


TaqI enzimi ile kesim ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü



Xba enzimi ile kesim ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü

EK 12. P5 82 örnek Hpmse031 primeri PCR amplifikasyon ürünleri agaroz jel görüntüsü



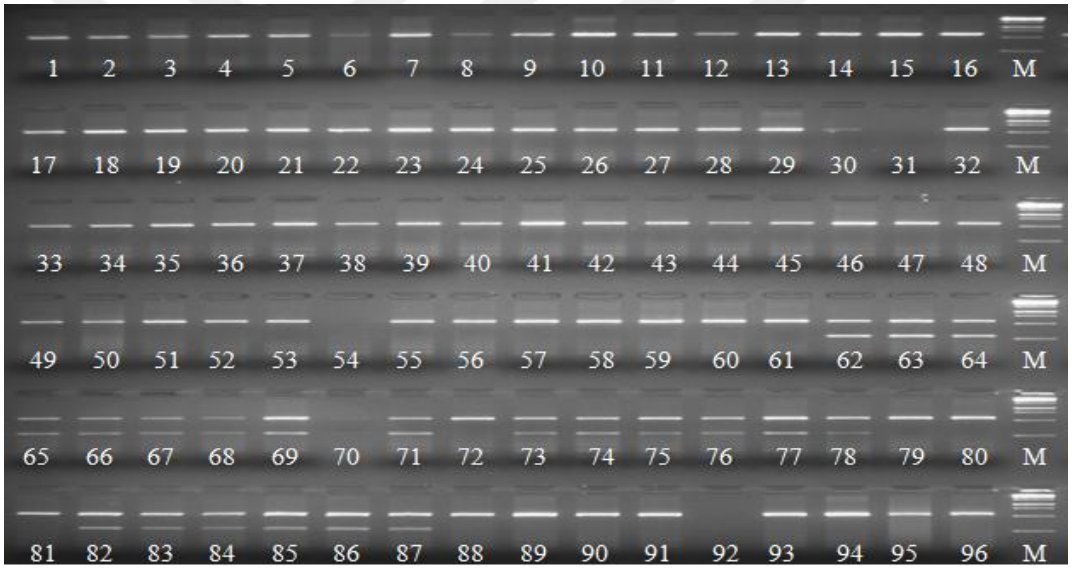
EK 13. P5 82 örnek SCAC568 ve Hpmse031 markırlarından elde edilen sonuçların moleküler karakterizasyonu

örnek	SCAC568	Hpmse031	örnek	SCAC568	Hpmse031
1	rr	rr	**42**	rr	rr
2	rr	rr	**43**	rr	rr
3	rr	rr	**44**	rr	rr
4	rr	rr	**45**	Rr	Rr
5	?	rr	**46**	Rr	Rr
6	rr	rr	**47**	rr	rr
7	Rr?	rr	**48**	rr	rr
8	rr	rr	**49**	Rr	Rr
9	rr	rr	**50**	Rr	Rr
10	rr	rr	**51**	Rr	Rr
11	rr	rr	**52**	RR	RR
12	rr	rr	**53**	RR	RR
13	rr	rr	**54**	Rr	Rr
14	rr	rr	**55**	Rr	Rr
15	rr	rr	**56**	Rr	Rr
16	rr	rr	**57**	Rr	Rr
17	rr	rr	**58**	rr	RR
18	rr	rr	**59**	Rr	Rr
19	rr	rr	**60**	rr	rr
20	rr	rr	**61**	Rr	Rr
21	rr	rr	**62**	Rr	Rr
22	rr	rr	**63**	RR	RR
23	rr	rr	**64**	rr	rr
24	rr	rr	**65**	rr	rr
25	rr	rr	**66**	rr	rr
26	rr	rr	**67**	rr	rr
27	rr	rr	**68**	rr	rr
28	rr	rr	**69**	rr	rr
29	rr	rr	**70**	rr	rr
30	rr	rr	**71**	rr	rr
31	rr	rr	**72**	rr	rr
32	rr	rr	**73**	rr	rr
33	rr	rr	**74**	rr	rr
34	rr	rr	**75**	rr	rr
35	rr	rr	**76**	rr	rr
36	rr	rr	**77**	rr	rr
37	rr	rr	**78**	rr	rr
38	rr	rr	**79**	rr	rr
39	rr	rr	**80**	rr	rr
40	rr	rr	**81**	rr	rr
41	rr	rr	**82**	rr	rr

EK 14. P6 96 örnek Xba ve TaqI enzimleri ile kesim ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

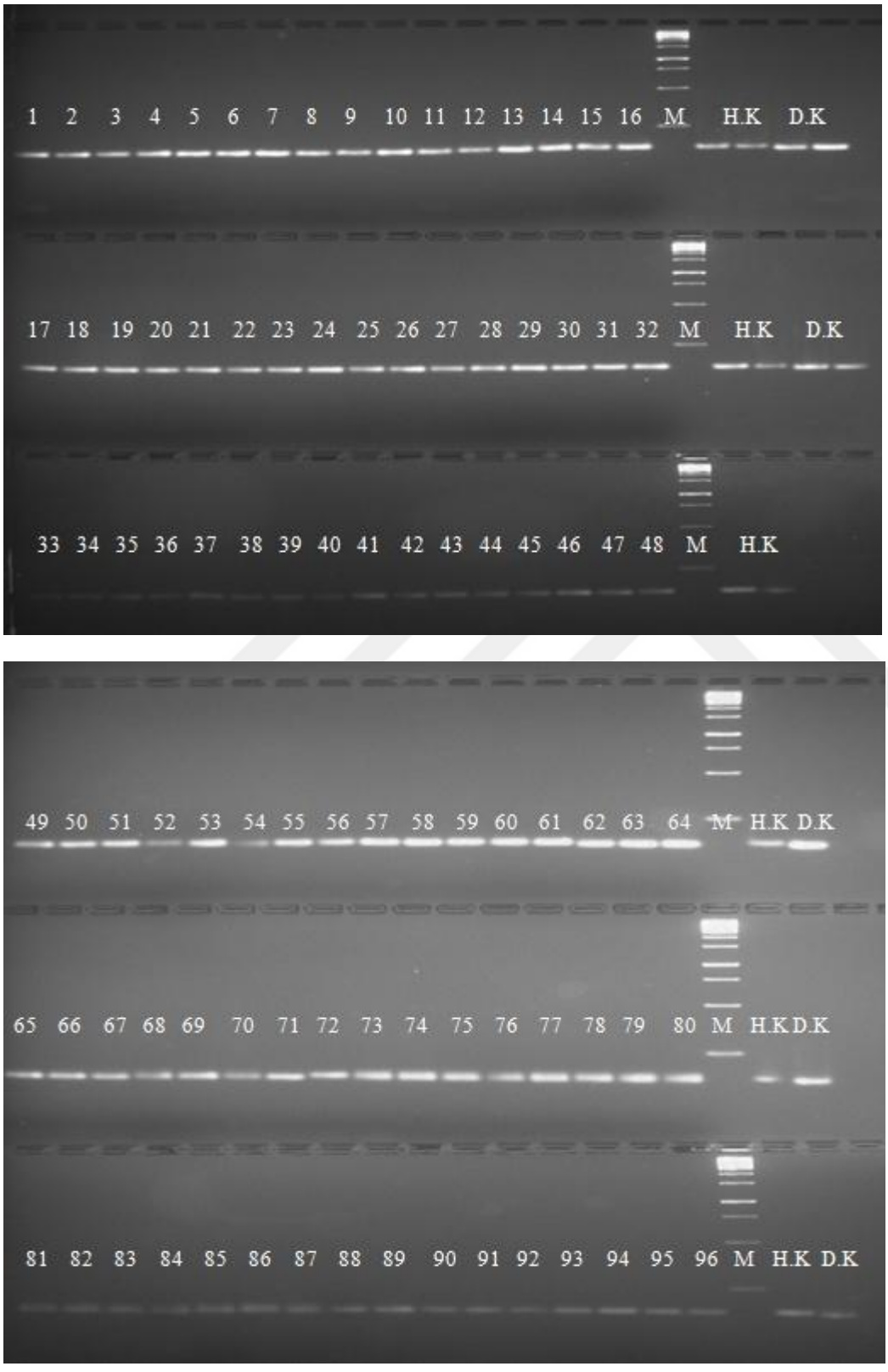


TaqI enzimi ile kesim ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü

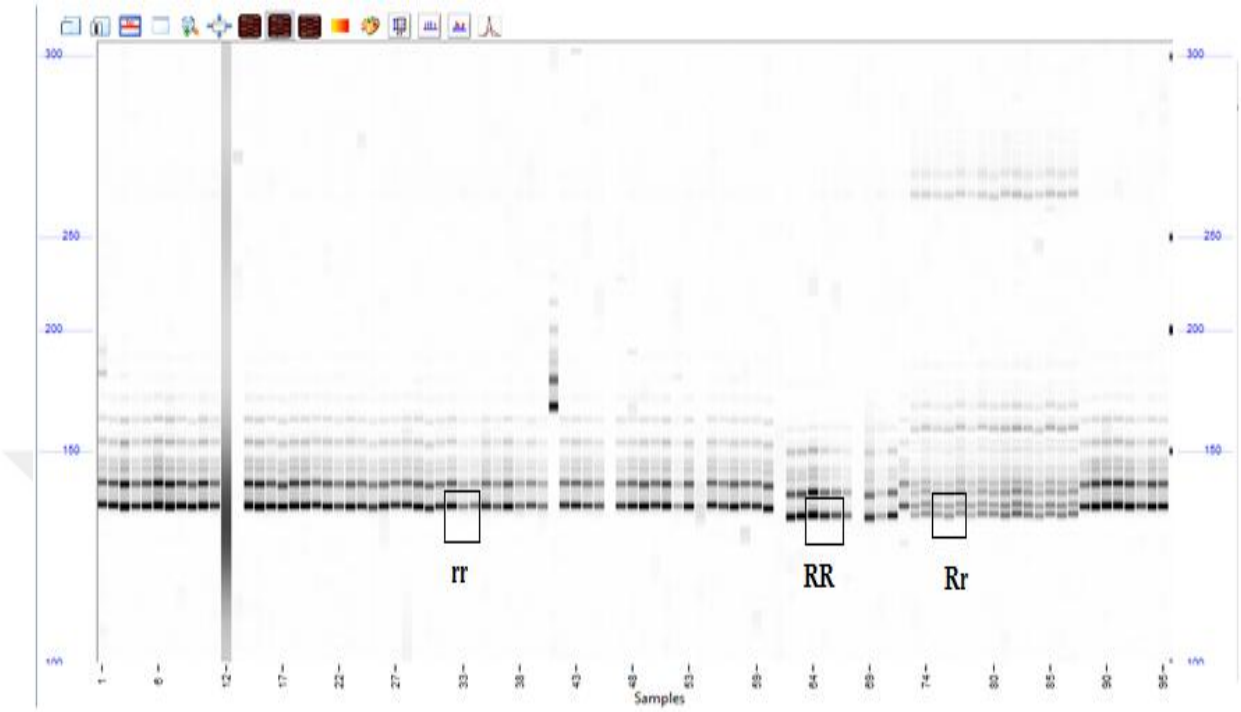


Xba enzimi ile kesim ürünlerine ait agaroz jel görüntüsü

EK 15. P6 96 örnek Hpmse031 primeri PCR amplifikasyon ürünleri agaroz jel görüntüsü



EK 16. P6 96 örnek HpmsE031 primeri ile PCR amplifikasyon ürünleri Fragment Analyzer™ görüntüsü



EK 17. P6 96 örnek SCAC568 ve Hpmse031 markırlarından elde edilen moleküler sonuçlar

örnek	SCAC568	Hpmse031	örnek	SCAC568	Hpmse031
1	rr	rr	**49**	rr	rr
2	rr	rr	**50**	rr	rr
3	rr	rr	**51**	rr	rr
4	rr	rr	**52**	rr	rr
5	rr	rr	**53**	rr	rr
6	rr	rr	**54**	-	rr
7	rr	rr	**55**	rr	rr
8	rr	rr	**56**	rr	rr
9	rr	rr	**57**	rr	rr
10	rr	rr	**58**	rr	rr
11	rr	rr	**59**	rr	rr
12	rr	rr	**60**	rr	rr
13	rr	rr	**61**	rr	rr
14	rr	rr	**62**	RR	RR
15	rr	rr	**63**	RR	RR
16	rr	rr	**64**	RR	RR
17	rr	rr	**65**	RR	RR
18	rr	rr	**66**	RR	RR
19	rr	rr	**67**	RR	RR
20	rr	rr	**68**	RR	RR
21	rr	rr	**69**	Rr	RR
22	rr	rr	**70**	R?	RR
23	rr	rr	**71**	RR	RR
24	rr	rr	**72**	rr	rr
25	rr	rr	**73**	Rr	Rr
26	rr	rr	**74**	Rr	Rr
27	rr	rr	**75**	Rr	Rr
28	rr	rr	**76**	Rr	Rr
29	rr	rr	**77**	Rr	Rr
30	rr	rr	**78**	Rr	Rr
31	rr	rr	**79**	rr	Rr
32	rr	rr	**80**	rr	Rr
33	rr	rr	**81**	rr	Rr
34	rr	rr	**82**	Rr	Rr
35	rr	rr	**83**	Rr	Rr
36	rr	rr	**84**	Rr	Rr
37	rr	rr	**85**	Rr	Rr
38	rr	rr	**86**	Rr	Rr
39	rr	rr	**87**	Rr	Rr
40	rr	rr	**88**	rr	rr
41	rr	rr	**89**	rr	rr
42	rr	rr	**90**	rr	rr
43	rr	rr	**91**	rr	rr
44	rr	rr	**92**	-	rr
45	rr	rr	**93**	rr	rr
46	rr	rr	**94**	rr	rr
47	rr	rr	**95**	rr	rr
48	rr	rr	**96**	rr	rr



ÖZGEÇMİŞ

Selcan SEVİNÇ SOLAK 1984 yılında Amasya'da doğdu. İlk ve orta öğretimini Konya'da, lise öğretimini Antalya'da tamamladı. 2003 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesinden 2007 yılında mezun oldu. 2012-2013 eğitim-öğretim yıl Güz Döneminde Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.