

Bazı Biber Çeşit ve Islah Hatlarının Potato virus Y (PVY)'nin 0 ve 1 Patotiplerine Reaksiyonlarının ve PVY'ye Resesif Dayanıklılıkta Rol Oynayan Genlerinin Araştırılması

İlyas DELİGÖZ^{1*}, Miray ARLI SÖKMEN²

¹Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Bitki Sağlığı Bölümü, Samsun

²Ondokuzmayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Samsun

*Sorumlu Yazar: ilyasdeligoz@yahoo.com

Geliş Tarihi: 16.08.2021 Düzeltme Geliş Tarihi: 27.05.2022 Kabul Tarihi: 27.05.2022

Öz

Potato virus Y biberde enfeksiyon oluşturan en yaygın virüslerden bir tanesidir. Bu çalışmada, 23 biber çeşidi ve 30 ıslah hattının PVY-0 ve PVY-1 patotiplerine karşı reaksiyonları belirlenmiş ve *pvr2* lokusundaki *pvr2* allel genleri mekanik inokulasyon ve moleküler yöntemler ile belirlenmeye çalışılmıştır. Her çeşit ve hatta ait dörder bitki, PVY-0 ve PVY-1 patotipleri ile ayrı ayrı inokule edilmiştir. İnokule edilen bitkiler, virüs belirtileri ve DAS-ELISA sonuçlarına göre değerlendirilmiştir. Daha sonra dayanıklı ve hassas olarak belirlenen bazı çeşitlerin, tetra primer amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction (ARMS-PCR) yöntemi kullanılarak *pvr2* allelleri belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışma sonucunda test edilen ıslah hatlarının tamamı her iki patotipe hassas olarak bulunmuştur. Üç ticari çeşit her iki patotipe dayanıklı olarak belirlenirken bir çeşit ise PVY-0'a karşı dayanıklı olarak belirlenmiştir. Ayrıca, *pvr2+* alleli bütün hassas bitkilerde belirlenirken, *pvr2*¹, *pvr2*² ve *pvr2*³ allelleri yalnızca dayanıklı genotiplerde belirlenmiştir. Moleküler çalışma sonuçları, resesif *pvr2* allellerine spesifik SNP (tek nükleotid polimorfizm) markörleri ve tetra primer ARMS PCR metodunun biber ıslah programlarında PVY'ye dayanıklı ve hassas genotiplerin seçiminde kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Biber, Potato virus Y, dayanıklılık, SNP markör

Reactions of Some Pepper Breeding Lines and Cultivars to Pathotypes 0 and 1 of Potato virus Y (PVY) and Analyzing Recessive Resistance Genes in Pepper Plants

Abstract

Potato virus Y is considered one of the most common virus infecting pepper crops. In this study, a total of 23 commercial pepper cultivars and 30 breeding lines were screened for their reaction to PVY-0 and PVY-1 pathotypes and the presence of *pvr2* allele genes at the *pvr2* locus were investigated using mechanical inoculation and molecular methods. Four plants of each pepper cultivars and lines were inoculated with PVY-0 and PVY-1 pathotypes. Inoculated plants were evaluated according to virus symptom appearance and DAS-ELISA results. Some resistant and susceptible pepper cultivars and lines were further characterized using tetra-primer amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction (ARMS-PCR) to identify the *pvr2* alleles. Results showed that all breeding lines were susceptible to both pathotypes. Three commercial pepper cultivars were resistant to both PVY-0 and PVY-1, and however, one cultivar was resistant to only PVY-0. Additionally, *pvr2+* allele was determined in all the susceptible pepper genotypes whereas *pvr2*¹, *pvr2*² and *pvr2*³ alleles were determined in only resistant genotypes. The results of molecular studies indicated that SNP (single nucleotide polymorphism) markers, which are specific for the recessive *pvr2* alleles, and the tetra primer ARMS PCR method could be used for selecting PVY-resistant and susceptible genotypes in pepper breeding programs.

Key words: Pepper, Potato virus Y, resistance, SNP marker

Giriş

Biber (*Capsicum annuum* L.); *Solanaceae* familyası *Capsicum* cinsine dahil olan bir bitki türü olup, domates ve hıyardan sonra dünyada en yaygın olarak yetiştirilen sebze türüdür. Dünya genelinde yıllık biber üretimi 36136996 ton olup Türkiye, 2636905 ton üretim ile Çin, Meksika ve Endonezya'dan sonra 4. sırada yer almaktadır (FAO, 2022). Potato virus Y (PVY) başta patates, biber, domates, tütün ve *Solanaceae* familyasına ait diğer bitkiler olmak üzere 31 familyaya ait 495 türde enfeksiyon oluşturabilen bir virüs türü olup, mekanik olarak ve yaklaşık 73 yaprak biti türü ile non-persistent şekilde taşınabilmektedir (Varveri, 2000; Kerlan ve Moury, 2008). Başta Akdeniz ülkeleri olmak üzere, dünyanın pek çok bölgesinde biberde yaygın olarak enfeksiyon oluşturan PVY'nin neden olduğu verim kayıpları hassas çeşitlerde % 80'e ulaşabilmektedir (Hamalainen ve ark., 1997). Virüsün ırk ve patotipleri enfekte ettikleri ürün guruplarına göre sınıflandırılmakta olup, biberdeki patotipleri 0, 1 ve 1,2 şeklinde adlandırılmaktadır. Türkiye'de bugüne kadar yapılan çalışmalarda PVY-0 ve PVY-1 patotiplerinin biberde enfeksiyona neden olduğu belirlenmiş olup, yaygın patotipin ise PVY-0 olduğu tespit edilmiştir. (Palloix ve ark., 1994; Çelik ve ark., 2012; Deligöz ve Arlı Sökmen, 2020)

PVY ile mücadelede kültürel önlemler ve vektör kontrolü kısmen etkili olabilmekte ise de en etkili yöntem dayanıklı çeşitlerin kullanılmasıdır. Biberde PVY'ye karşı dayanıklılık, bazı resesif ve dominant genler tarafından sağlanmaktadır. Bu genlerden *pvr1* lokusunda bulunan resesif *pvr1* geni PVY'nin 0 patotipine karşı dayanıklılıkta rol oynamaktadır (Greenleaf, 1986; Ruffel ve ark., 2006). İkinci dayanıklılık lokusu olan *pvr2*'de bulunan *pvr2¹* alleli, PVY'nin 0 patotipine, *pvr2²* alleli ise PVY'nin 0 ve 1 patotiplerine karşı dayanıklılıkta rol oynamaktadır (Kyle ve Palloix, 1997). Diğer allel *pvr2³*, kantitatif dayanıklılık lokusları (Quantitative resistance locus=QRL) içerisinde majör etkiye sahip bir gen olarak PVY-0, PVY-1 ve PVY-1,2 patotiplerine karşı dayanıklılıkta etkili olmaktadır (Caranta ve ark., 1997; Ayme ve ark., 2007). Bu genlerden farklı olarak resesif *pvr3*'ün PVY-0 patotipine, dominant *Pvr4* geninin PVY-0, PVY-1 ve PVY-1,2 patotiplerine ve resesif *pvr5* geninin ise PVY-0 patotipine karşı dayanıklılıkta rol oynadığı bildirilmiştir (Palloix, 1992; Dogimont ve ark., 1996). Yapılan araştırmalar, biberde PVY'ye dayanıklılıkta rol oynayan resesif genlerin ökaryotik transkripsiyon başlatma faktörü olan *eIF4E* geni ile ilişkili olduğunu (bu genin homoloğu) göstermiştir (Shopan ve ark., 2020). Biberde *pvr2* lokusu tarafından kodlanan *eIF4E* geninin genomik dizileri

kullanılarak yapılan analizde ise lokusun, beş exon ve dört introndan oluştuğu (Ruffel ve ark., 2004), *pvr2* allel genlerinde (*pvr2⁺*, *pvr2¹*, *pvr2²*, *pvr2³*) yalnızca 2-4 nükleotidlik farklılıklar olduğu ve bu genlerin *eIF4E* genindeki mutasyonlar sonucu meydana geldiği ortaya konulmuştur (Ruffel ve ark., 2002; Robaglia ve Caranta, 2006).

Türkiye'de biberde PVY patotiplerine dayanıklılık ile ilgili sınırlı sayıda çalışma yapılmış olup (Buzkan ve ark., 2012; Çelik ve ark., 2012; Çelik ve ark., 2013; Karataş ve ark., 2017), bu çalışmalarda farklı biber hat ve çeşitlerinde PVY'ye karşı dayanıklılık bulunduğu belirlenmiştir. Ülkemizde markör destekli ıslah çalışmalarının fasülye (Yeken ve ark. 2018), buğday (Kurt Polat ve Yağdı, 2021) ve biber (Özkaynak ve ark., 2014) gibi farklı ürünlerde örnekleri bulunmaktadır. Bununla birlikte biberde PVY'ye karşı dayanıklılıkta rol oynayan *pvr2* allel genlerinin moleküler yöntemlerle belirlenmesi ile ilgili ise herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada bazı biber hat ve çeşitlerinin Samsun ilinde belirlenmiş olan PVY-0 ve PVY-1 patotiplerine karşı dayanıklılık durumlarının araştırılması ve dayanıklılıkta rol oynayan *pvr2* allel genlerinin moleküler yöntemlerle ortaya konulması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

PVY patotipleri

Biber çeşitleri ve ıslah hatlarının PVY'ye karşı dayanıklılık durumlarının belirlenmesinde PVY-0 patotipi olarak SB-12 izolatu, PVY-1 patotipi olarak ise SÇ-87 izolatu kullanılmıştır. Her iki patotip, Samsun ilinde biber bitkilerinden izole edilmiş ve hassas Yolo Wonder çeşidinde çoğaltılarak muhafaza edilmiştir.

Dayanıklılık testlerinde kullanılan biber hat ve çeşitleri

Dayanıklılık testlerinde Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Biber Islah Projesi kapsamında verim ve kalite kriterleri açısından ön plana çıkmış olan 30 biber hattı ve ticari olarak kullanılan 23 biber çeşidi kullanılmıştır. Ayrıca dayanıklı kontrol olarak PVY'nin her 3 patotipine de dayanıklı olan CM-334 hattı, hassas kontrol olarak ise olarak PVY'nin 3 patotipine de hassas olan Yolo Wonder (Gebre-Selassie ve ark., 1985) çeşidi kullanılmıştır. Biber hatlarına ait tohumlar Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden, biber çeşitlerine ait tohumlar farklı ticari firmalardan, patotip ayırım setindeki çeşitlere ait tohumlar ise North Central Regional Plant Introduction Station, Iowa State University, USDA-ARS, ABD'den temin edilmiştir.

Çizelge 1. Resesif *pvr2* allel genlerine spesifik primerler ve dizileri (Rubio ve ark., 2008)

Primerler	Dizi	Beklenen büyüklük (bp)	Hedef allel	
A614G	FI	AATGGAAGCAGTTTCTGGATTACAGAGG	177	<i>pvr2</i> ³
	RI	ATACGTGAAATATGAAGCCAACACGGT	127	<i>pvr2</i> ^{+,1,2}
	FO	CGTTGTAACACTATTCTACCGCCATGCTT	249	
	RO	TGTAACGATTCTTTGCATTTCTGTCTGA	249	
G325A	FI	CACCCAAGCAAGTTAGTTGTGGGAGAAA	198	<i>pvr2</i> ²
	RI	AATTTTATGCTTGAAACAATGTAATTC	288	<i>pvr2</i> ^{+,1,3}
	FO	GTAATTATGTGAATTTGGTGTCTGCCTT	431	
	RO	TACTAGAGTGACCAATCACTACGAGCTG	431	
T200A	FI	TCATGGACTTTCTGGTTTGATAATCCCGT	199	<i>pvr2</i> ⁺
	RI	CCAAGCAGCTTGTTCGATTTCTGCTCT	258	<i>pvr2</i> ^{1,2,3}
	FO	TCCCGAAAGTAAAAAAGCACACAGCAC	402	
	RO	TCGTGATTGTTTCGATTTCCCTAATACCC	402	

FI: Forward Inner FO: Forwar Outer, RI: Reverse Inner, RO: Reverse Outer. Her sette FO ve RO primerleri bütün genotiplerde bulunan yaygın alleli çoğaltır. FI ve RI primerler ise allel spesifiktir.

Biber çeşitleri ve ıslah hatlarının PVY-0 ve PVY-1 patotiplerine karşı reaksiyonlarının belirlenmesi

Biber çeşitleri ve ıslah hatlarının PVY'ye karşı dayanıklılık durumlarının belirlenmesinde her bir patotip ayrı ayrı olmak üzere, çalışmada kullanılan çeşit ve hatlara 4 tekerrürlü olacak şekilde inokule edilmişlerdir. Bu amaçla biber çeşit ve hatlarına ait tohumlar torfla doldurulmuş viyollere veya küçük plastik kaplara ekilmiş ve fideler ilk gerçek yapraklarını oluşturduklarında 3:1 oranında torf-perlit karışımı bulunan saksılara şaşırtılmıştır. Fosfat tampon (0.02 M, pH: 7.0) çözeltisinde 1:10 (gr/ml) oranında sulandırıldıktan sonra homojenize edilerek hazırlanan PVY izolatlarına ait inokulumlar, şaşırtma işleminden 1-2 gün sonra mekanik inokulasyon yöntemi kullanılarak fidelere inokule edilmişlerdir (Echer ve Costa, 2002; Çelik ve ark., 2012). Bu işlemden sonra yapraklar musluk suyu ile yıkanmıştır. İnokulasyon sonrası bitkiler, ortalama 25°C sıcaklık içeren sera koşullarında 21 gün gözlenmiş ve belirtiler kaydedilmiştir. Ayrıca, bitkiler inokulasyondan 21 gün sonra double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) yöntemi (Clark ve Adams, 1977) ile test edilmiştir. İnokulasyon sonrası sistemik belirti gösteren ve DAS-ELISA sonucu pozitif olan bitkiler hassas (H), sistemik belirti göstermeyen ve DAS-ELISA sonucu negatif olan bitkiler ise dayanıklı (D) olarak değerlendirilmiştir.

Resesif *pvr2* allel genlerinin moleküler olarak belirlenmesi

Çalışmada kullanılan biber hat ve çeşitlerinde resesif *pvr2* allel genlerinin (*pvr2*⁺,

*pvr2*¹, *pvr2*² ve *pvr2*³) varlığı bu genlerle bağlı SNP markörleri kullanılarak tetra primer amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction (ARMS-PCR) yöntemi ile belirlenmeye çalışılmıştır (Rubio ve ark., 2008).

DNA izolasyonu

Denemede kullanılan biber bitkilerinden DNA'lar DNeasy DNA ekstraksiyon kiti (Qiagen, Almanya) protokolüne göre izole edilmiştir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Çalışmada Rubio ve ark. (2008) tarafından geliştirilen ve *pvr2* allellerine spesifik olan SNP markörleri kullanılmıştır. Metabion (Almanya) firması tarafından sentezlenen 3 primer seti kullanılarak 3 ayrı PCR reaksiyonu oluşturulmuştur. PCR reaksiyonu 2.5 µl 10xPCR buffer (15 mM MgCl₂ içeren), 0.5 µl 10 mM dNTPs, A614G seti için 0.5 µl (2 pmol) forward inner primer, 0.375 µl (1.5 pmol) forward outer primer, 0.5 µl (2 pmol) reverse inner primer, 0.375 µl (1.5 pmol) reverse outer primer, G325A seti için 0.5 µl (2 pmol) forward inner primer, 0.5 µl (2 pmol) forward outer primer, 1 µl (4 pmol) reverse inner primer, 0.5 µl (2 pmol) reverse outer primer, T200A seti için 0.75 µl (3 pmol) forward inner primer, 0.25 µl (1 pmol) forward outer primer, 0.5 µl (2 pmol) reverse inner primer, 0.25 µl (1 pmol) reverse outer primer, 0.25 µl Taq DNA polimeraz (Sigma) ve 1 µl DNA (50 ng toplam DNA)'dan oluşmuştur. Toplam reaksiyon hacmi RNase ve DNase içermeyen su ile 25 µl'ye tamamlanmıştır. Amplifikasyonlar Bio-Rad MJ Mini PCR

Thermocycler’de, 94 °C’de 3 dk (ilk denatürasyon), 35 döngü olacak şekilde 94 °C’de 30 s, A614G için: 56 °C’de, G325A için: 48 °C’de, T200A için 54 °C’de olmak üzere 30 s ve 72 °C’de 1 dk ve 1 döngü 72 °C’de 10 ile tamamlanmıştır (Rubio ve ark., 2008). Çalışmada kullanılan primer setlerine ait diziler, hedef alleller ve beklenen bant büyüklükleri Çizelge 1’de verilmiştir. Sonuçlar agaroz jel elektroforezi yöntemi ile değerlendirilmiştir. Jeldeki PCR fragmentlerinin analizi GelDoc 2000 (Biorad, ABD) jel görüntüleme sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiş ve jelde oluşan bantların fotoğrafları çekilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Biber çeşit ve hatlarının PVY patotiplerine karşı reaksiyonları

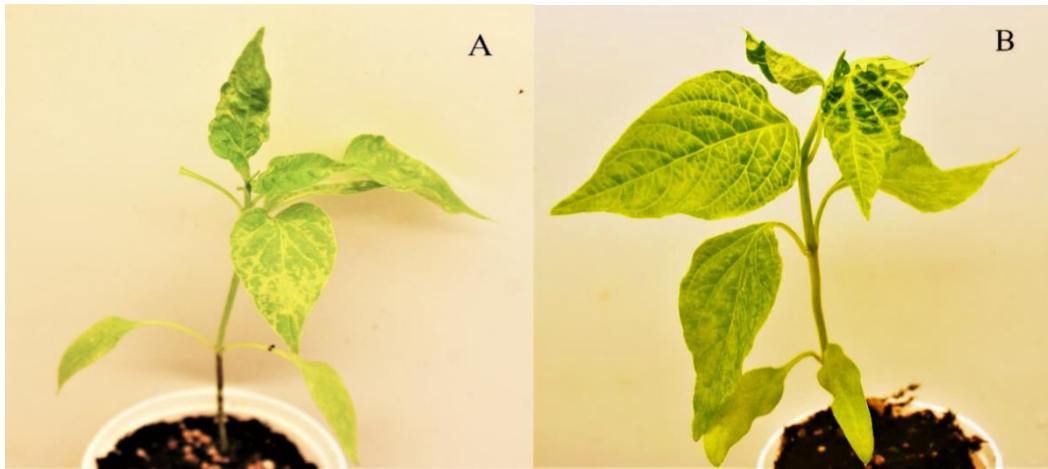
Çalışmada, 30 adet biber islah hattı ve çeşitli firmalardan temin edilen 23 adet biber çeşidinin PVY patotiplerine dayanıklılık durumları

araştırılmıştır. PVY-0 ve PVY-1 patotipleri ile ayrı ayrı inokule edilen 30 biber islah hattına ait bitkilerin tamamında inokulasyon sonrasında yapraklarda mozayik şeklinde sistemik belirtiler ortaya çıkmıştır (Şekil 1). Islah hatlarına ait bitkilere uygulanan DAS-ELISA testi sonucunda da tüm bitkiler pozitif reaksiyon vermiştir. Bu nedenle hatların tamamı hassas olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 2).

Çalışmada kullanılan 23 biber çeşidinin PVY-0 ve PVY-1 patotiplerine karşı test edilmesi sonucunda, 19 çeşit (Flora, Yellow Block, Orion, Venüs, Kapyra, Kandil Dolma, Cümbüş, Üçburun, Bafra, Elmas, Seki, Safran, Arena, Mert, Zafer, İstek, Dut, Dilber ve Abide) her iki patotiple inokulasyon sonrasında sistemik belirtiler oluşturmuş (Şekil 2) ve hassas olarak değerlendirilmiştir. Hassas olarak değerlendirilen çeşitlere ait bitkilere uygulanan ELISA sonuçları da pozitif olarak elde edilmiştir. Test



Şekil 1. A) PVY-0 patotipinin Alt 1570 biber hattında neden olduğu yapraklarda mozayik, B) PVY-1 patotipinin BK 2-5 biber hattında neden olduğu şiddetli mozayik belirtisi



Şekil 2. A) PVY-0 patotipinin Cümbüş çeşidinde neden olduğu yapraklarda mozayik belirtisi, B) PVY-1 patotipinin Venüs çeşidinde neden olduğu yapraklarda mozayik belirtisi

edilen çeşitlerden Menta her iki patotipe karşı herhangi bir semptom oluşturmamıştır. Buna karşın PVY-0 ile inokule edilen Menta çeşidine ait bitkilere uygulanan DAS-ELISA sonucu negatif olarak elde edilirken, PVY-1 patotipi ile inokule edilen Menta çeşidine ait bitkiler pozitif olarak elde edilmiştir. Menta çeşidinin inokulasyon ve DAS-ELISA sonuçları birlikte değerlendirildiğinde PVY-0'a karşı

dayanıklı olduğu belirlenmiştir. PVY-0 ve PVY-1 patotipleri ile inokule edilen Sahem, Drago ve Gaston çeşitlerine ait bitkilerde her iki patotiple inokulasyon sonrasında herhangi bir semptom oluşmamıştır. Sözü edilen çeşitlere ait bitkilerde yapılan DAS-ELISA testi sonucu da negatif olarak elde edilmiş ve bu çeşitlerin her iki patotipe karşı dayanıklı oldukları belirlenmiştir (Çizelge 3).

Çizelge 2. PVY-0 ve PVY-1 ile inokule edilen biber ıslah hatlarının dayanıklılık durumları

Islah Hatları	PVY-0		PVY-1	
	Reaksiyon	DAS-ELISA	Reaksiyon	DAS-ELISA
Bk-2-4-1	H	P	H	P
Bs 11-10-1	H	P	H	P
Bk-1-5	H	P	H	P
Bk-1-9	H	P	H	P
Bk 2-5-1	H	P	H	P
Bk-2-4-2	H	P	H	P
Bk-1-1	H	P	H	P
Bk-1-4-2	H	P	H	P
Alt 904 A	H	P	H	P
Alt 1570	H	P	H	P
Alt 831-A	H	P	H	P
907	H	P	H	P
882	H	P	H	P
881-A	H	P	H	P
Ty-35	H	P	H	P
Ty-311	H	P	H	P
Ty-283	H	P	H	P
Bs-11-2-1	H	P	H	P
Bs-5-2	H	P	H	P
S-3-1	H	P	H	P
S-14-1	H	P	H	P
14	H	P	H	P
49-3	H	P	H	P
137	H	P	H	P
138	H	P	H	P
129	H	P	H	P
173	H	P	H	P
875	H	P	H	P
903	H	P	H	P
Çtk-2010	H	P	H	P
Y.Wonder (Hassas Kontrol)	H	P	H	P
CM 334 (Dayanıklı Kontrol)	D	N	D	N

H: Hassas, D: Dayanıklı, P: Pozitif, N: Negatif

Çalışmada dayanıklı kontrol olarak kullanılan CM-334 çeşidine ait bitkilerde, PVY-0 ve PVY-1 patotiplerinin inokulasyonu sonrasında herhangi bir belirti oluşumu gözlenmezken, hassas kontrol olarak kullanılan Wolo Wonder çeşidinde ise sistemik belirtiler oluştuğu görülmüştür. Buzkan ve ark. (2012), iki çeşit (Maraş 1 ve Sena) ve 15 adet yerel popülasyondan oluşan biber genotiplerinin PVY patotiplerine karşı reaksiyonlarını araştırmışlar ve tüm genotiplerin PVY-0 ve PVY-1 patotiplerine hassas olduklarını belirlemişlerdir. Çalışmada kullanılan biber çeşitlerinin 19 tanesi her iki patotipe karşı hassas

olarak belirlenirken yalnızca 4 tanesinde (Menta, Sahem, Drago ve Gaston) dayanıklılık belirlenmiştir. Bu çeşitlerden Menta yalnızca PVY-0 patotipine, Sahem, Drago ve Gaston ise her iki patotipe de dayanıklı olarak belirlenmiştir. Çelik ve ark. (2012), 30 biber çeşidini Antalya ilinde biber bitkilerinden izole edilen PVY-0 patotipine karşı test etmişler ve yalnızca Campari çeşidinin dayanıklı olduğunu, Abide, Seki, Safran, Zafer, Mert ve Bafra çeşitlerinin bizim çalışmamızla benzer bir şekilde PVY-0 patotipine karşı hassas olduklarını belirlemişlerdir.

Çizelge 3. PVY-0 ve PVY-1 ile inokule edilen biber çeşitlerinin dayanıklılık durumları

Çeşitler	PVY-0		PVY-1	
	Reaksiyon	DAS-ELISA	Reaksiyon	DAS-ELISA
Menta	D	N	H	P
Sahem	D	N	D	N
Drago	D	N	D	N
Gaston	D	N	D	N
Flora	H	P	H	P
Yellow Block	H	P	H	P
Orion	H	P	H	P
Venüs	H	P	H	P
Kapya	H	P	H	P
Kandil Dolma	H	P	H	P
Cümbüş	H	P	H	P
Üçburun	H	P	H	P
Bafra	H	P	H	P
Elmas	H	P	H	P
Seki	H	P	H	P
Safran	H	P	H	P
Arena	H	P	H	P
Mert	H	P	H	P
Zafer	H	P	H	P
İstek	H	P	H	P
Dut	H	P	H	P
Dilber	H	P	H	P
Abide	H	P	H	P
Y.Wonder (Hassas Kontrol)	H	P	H	P
CM 334 (Dayanıklı Kontrol)	D	N	D	N

H: Hassas, D: Dayanıklı, P: Pozitif, N: Negatif

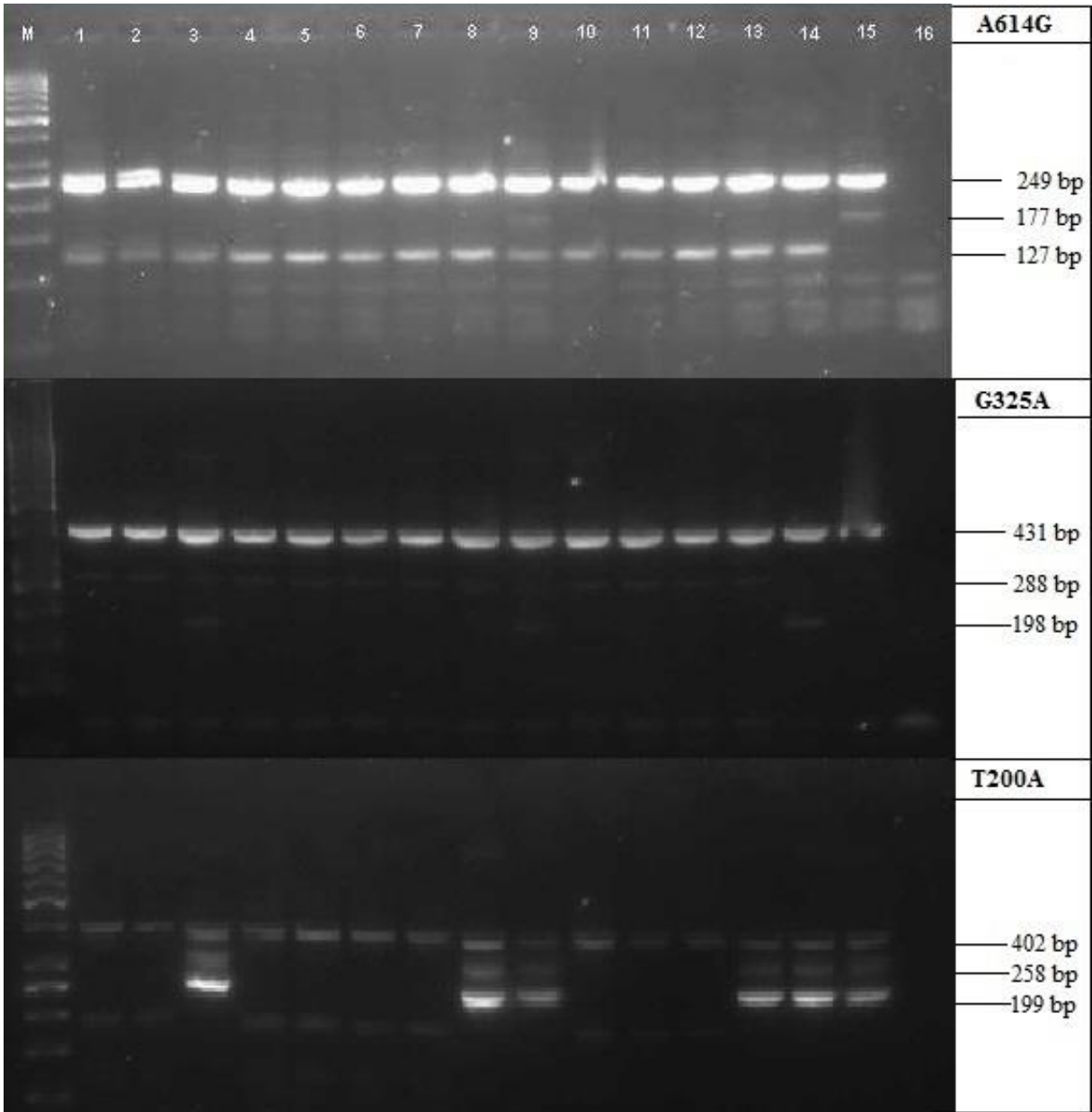
Biber çeşit ve hatlarının *pvr2* allel genleri

Reaksiyon testleri sonucunda dayanıklı olarak değerlendirilen 4 çeşit, hassas olarak değerlendirilen 5 çeşit ve 2 ıslah hattı ile kontrol olarak kullanılan patotip ayırım setine ait 4 çeşitte *pvr2* allel genlerinin varlığı ARMS-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışma sonucunda Yellow Block, Gaston, Flora, Bafra, Venüs, Abide çeşitleri ile 49-3 ve TY-35 hatlarında A614G primerleri ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonucunda jelde

127, 177 bp ve 249 bp büyüklüğünde, G235A primerleri ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonucunda 288 bp ve 431 bp büyüklüğünde, T200A primerleri ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonucunda 199 bp ve 402 bp büyüklüğünde bantlar elde edilmiş ve sözü edilen çeşit ve hatların tamamının *pvr2+* hassaslık alleline sahip oldukları belirlenmiştir. (Şekil 3 ve Çizelge 4). Yellow Block, Flora, Bafra, Venüs, Abide çeşitleri ile 49-3 ve TY-35 hatlarının, PVY-0 ve PVY-1 patotipleri kullanılarak

yapılan mekanik inokulasyonlar sonucunda her iki patotipe karşı hassas reaksiyon vermiş olmaları (Çizelge 2 ve 3) çeşit ve hatlardaki hassaslık allelinin varlığını doğrulamaktadır. Bununla birlikte Gaston çeşidi ise PVY-0 ve PVY-1 patotipleri kullanılarak yapılan mekanik inokulasyonlar sonucunda her iki patotipe karşı dayanıklı olarak belirlenmesine rağmen (Çizelge 3), moleküler çalışmalar sonucunda çeşidin *pvr2* lokusunda bulunan dayanıklılık genlerini içermediği, *pvr2+* hassaslık alleleline sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 3 ve Çizelge 4). Elde edilen sonuçlar Gaston çeşidinin PVY'nin üç patotipine karşı dayanıklılıkta rol

oynayan dominant *Pvr4* genine sahip olabileceğine işaret etmektedir. Karataş ve ark. (2017), 43 kırmızı biber hattını PVY'nin 0, 1 ve 1,2 patotiplerine karşı test etmişler ve üç hattın PVY'nin üç patotipine karşı da dayanıklı olduklarını belirlemişlerdir. Araştırmacılar dayanıklı hatların *Pvr4* geni kaynağı olan CM-334 melez bireylerinden elde edilmesi nedeni ile dayanıklılığın *Pvr4* geni tarafından sağlandığını bildirmişlerdir. Biberde *Pvr4* geninin, PVY'nin her üç patotipine karşı dayanıklılıkta rol oynadığı yapılan farklı çalışmalarda ortaya konulmuştur (Pasko ve ark., 1992; Dogimont ve ark., 1996).



Şekil 3. Tetra primer ARMS-PCR sonucu elde edilen amplifikasyon ürünleri. M: 50 bp moleküler markör (Promega). 1: Yellow Block, 2: Gaston F1, 3: Drago F1, 4: 49-3, 5: Flora F1, 6: Bafra F1, 7: Venüs F1, 8: Menta RZ, 9: Sahem F1, 10: TY-35, 11: Abide F1, 12: Yolo Wonder (*pvr2*⁺) 13: Yolo Y (*pvr2*¹) 14: FVR-2 (*pvr2*²) 15: CM-334 (*pvr2*³) 16: Negatif kontrol

Çizelge 4. Tetra primer ARMS PCR yöntemi sonucunda biber hat ve çeşitlerinin genotipleri

Primer	A614G		T200A		G325A		Genotip
bp	127	177	258	199	288	198	
<i>pvr</i>	2 ⁺ ,2 ¹ ,2 ²	2 ³	2 ¹ ,2 ² ,2 ³	2 ⁺	2 ⁺ ,2 ¹ ,2 ³	2 ²	
Biber Çeşitleri/Hatları							
Yellow Block	+	-	-	+	+	-	<i>pvr2</i> ⁺
Gaston F1	+	-	-	+	+	-	<i>pvr2</i> ⁺
Drago F1	+	-	+	-	-	+	<i>pvr2</i> ²
49-3	+	-	-	+	+	-	<i>pvr2</i> ⁺
Flora F1	+	-	-	+	+	-	<i>pvr2</i> ⁺
Bafra F1	+	-	-	+	+	-	<i>pvr2</i> ⁺
Venüs F1	+	-	-	+	+	-	<i>pvr2</i> ⁺
Menta Rz	+	-	+	-	+	-	<i>pvr2</i> ¹
Sahem F1	+	+	+	-	+	+	<i>pvr2</i> ² , <i>pvr2</i> ³
TY-35	+	-	-	+	+	-	<i>pvr2</i> ⁺
Abide F1	+	-	-	+	+	-	<i>pvr2</i> ⁺
Yolo Wonder (<i>pvr2</i> ⁺)	+	-	-	+	+	-	<i>pvr2</i> ⁺
Yolo Y (<i>pvr2</i> ¹)	+	-	+	-	+	-	<i>pvr2</i> ¹
Florida VR-2 (<i>pvr2</i> ²)	+	-	+	-	-	+	<i>pvr2</i> ²
CM 334 (<i>pvr2</i> ³)	-	+	+	-	-	-	<i>pvr2</i> ³

Menta çeşidinde A614G primerleri ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonucunda jelde 127 bp ve 249 bp büyüklüğünde, G235A primerleri ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonucunda jelde 288 bp ve 431 bp büyüklüğünde, T200A için oluşturulan jelde ise 258 bp ve 402 bp büyüklüğünde bantlar elde edilmiştir. Sonuçlar çeşidin yalnızca *pvr2*¹ dayanıklılık alleline sahip bir belirti sergilememesi, çeşitte belirti oluşumunu engelleyebilen başka dayanıklılık genlerinin olabileceğine işaret etmektedir. Drago çeşidinde A614G primerleri ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonucunda jelde 127 bp ve 249 bp büyüklüğünde, G235A için oluşturulan jelde 198 bp ve 431 bp büyüklüğünde, T200A için oluşturulan jelde 258 bp ve 402 bp büyüklüğünde bantlar elde edilmiş ve çeşidin *pvr2*² dayanıklılık alleline sahip olduğu ortaya konulmuştur. Moleküler markör çalışmaları, Drago çeşidinin *pvr2*² allel genini taşıdığını göstermiştir (Şekil 3 ve Çizelge 4). Drago çeşidinin PVY-0 ve PVY-1 patotipleri kullanılarak yapılan mekanik inokulasyonlar sonucunda her iki patotipe karşı da dayanıklı olarak belirlenmesi moleküler markör sonuçlarını doğrulamaktadır.

Sahem çeşidinde A614G primerleri ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonucunda jelde 127 bp, 177 bp ve 249 bp büyüklüğünde, G235A için oluşturulan jelde 198 bp, 298 bp ve 431 bp büyüklüğünde, T200A için oluşturulan jelde 258 bp ve 402 bp büyüklüğünde bantlar elde edilmiş ve çeşidin *pvr2*² ve *pvr2*³ dayanıklılık allellerinin her ikisine de sahip olduğu ortaya konulmuştur (Şekil 3 ve Çizelge 4). PVY-0 ve PVY-1 patotipleri kullanılarak yapılan mekanik inokulasyonlar sonucunda, Sahem çeşidi her iki patotipe karşı da

olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 3 ve Çizelge 4). Menta çeşidinin PVY-0 patotipine karşı dayanıklı, PVY-1 patotipine karşı ise hassas reaksiyon vermesi (Çizelge 3), çeşitteki *pvr2*¹ allel geninin varlığına doğrulamaktadır. Buna karşın PVY-1 patotipi ile inokule edilen Menta çeşidinin, DAS-ELISA sonucunun pozitif elde edilmesine rağmen herhangi

dayanıklı olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 3). Bu durum, çeşitte *pvr2*² geninin olduğunu doğrulamaktadır. Resesif *pvr2*² allelinin, PVY'nin 0 ve 1 patotiplerine karşı dayanıklılıkta rol oynadığı (Kyle ve Palloix, 1997), resesif *pvr2*³ allelinin ise QRL (quantitative resistance loci) içerisinde majör etkiye sahip bir gen olarak PVY'nin 0, 1 ve 1-2 patotiplerine karşı dayanıklılıkta etkili olduğu bildirilmiştir (Caranta ve ark., 1997; Ayme ve ark., 2007). Çalışmada kontrol olarak kullanılan Yolo Wonder (*pvr2*⁺), Yolo Y (*pvr2*¹), Florida VR-2 (*pvr2*²) ve CM 334 (*pvr2*³) çeşitlerine ait jelde oluşan bantlar, sahip oldukları dayanıklılık allelleri ile uyumluluk göstermiştir.

Çalışmada çeşit ve hatların mekanik inokulasyon yöntemi kullanılarak elde edilen dayanıklılık test sonuçları ile tetra primer ARMS PCR yöntemi kullanılarak elde edilen moleküler markör sonuçları birbiri ile uyumlu olarak elde edilmiştir. Bu durum çalışmada kullanılan SNP markörlerinin *pvr2* allel genlerinin belirlenmesinde güvenilir olduğunu ortaya koymuştur. Rubio ve ark. (2008), SNP markörleri kullanılarak ARMS-PCR yöntemi ile yaptıkları çalışmada da benzer bir şekilde SNP markörlerinin *pvr2* allel genlerinin belirlenmesinde doğru sonuçlar verdiğini belirlemişlerdir. Moodley ve ark. (2019), *pvr2*¹ ve

*pvr2*² genlerini taşıyan lokal biber genotiplerinden homozigot biber hatlarının geliştirilmesi ile ilgili yaptıkları çalışmalarda, F₂ bireylerinde tetra primer ARMS-PCR yönteminin *pvr2* allel genlerinin seleksiyonunda kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır.

Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmada test edilen biber hatlarının tamamının PVY-0 ve PVY-1 patotiplerine karşı hassas olarak bulunmaları, ıslah hatları geliştirilirken PVY'ye karşı dayanıklılık açısından değerlendirilmediğini ve gen havuzunda söz konusu virüse karşı dayanıklı genotiplerin bulunmadığını ortaya koymuştur. Dayanıklılık olarak belirlenen çeşitler, PVY'nin sorun olduğu alanlarda bölge üreticilerine önerilebilir ve ayrıca biberde dayanıklılık ıslahı çalışmalarında gen kaynağı olarak kullanılabilir. Çalışmada kullanılan markörlerin PVY'ye dayanıklı biber çeşitlerinin geliştirilmesi ile ilgili çalışmalarda *pvr2* allel genlerinin seleksiyonunda kullanılması, biber ıslahı çalışmalarına önemli katkılar sağlayacaktır.

Teşekkür: Bu araştırma, "Samsun ilinde biber üretim alanlarında enfeksiyon oluşturan Potato virus Y (PVY) patotiplerinin karakterizasyonu ve bazı biber çeşit ve hatlarının PVY'ye karşı dayanıklılık düzeylerinin araştırılması" isimli doktora tez çalışmasından üretilmiş ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi PYO.ZRT1904.10.019 nolu Proje ile desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması Beyanı: Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti: Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

Kaynaklar

Ayme, V., Petit-Pierre, J., Souche, S., Palloix, A., Moury, B., 2007. Molecular dissection of the Potato virus Y VPg virulence gene reveals complex adaptations to the *pvr2* resistance allelic series in pepper, *Journal of General Virology*, 88, 1594–1601.

Buzkan, N., Arpacı, B.B., Moury, B., Fabre, F., 2012. Sürekli virüs dayanıklılığı için Türkiye'de biberler ve potyvirusler arasındaki genetik ilişkinin analizi. TÜBİTAK TOVAG 109O447 Nolu Proje Sonuç Raporu, 54 s. http://uvt.ulakbim.gov.tr/uvt/index.php?cw id=9&vtadi=TPRJ&ano=145857_e8cbffd43b

bcd2dcce840b488d80db83 (erişim 19.06.2021).

- Caranta, C., Lefebvre, V., Palloix A., 1997. Polygenic resistance of pepper to potyviruses consists of a combination of isolate-specific and broad-spectrum quantitative trait loci, *Molecular Plant Microbe Interaction*, 10, 872–878.
- Çelik, N., Özalp, R., Göçmen, M., 2012. Antalya ili örtü altı biber yetiştiriciliğinde Patates Y Virüsü (PVY) patotiplerinin belirlenmesi ve bazı biber çeşitlerinin PVY'ye karşı reaksiyonları. *Bitki Koruma Bülteni*, 52 (3). 235-246.
- Çelik, İ., Özalp, R., Çelik, N., Polat, İ., Sülü, G., Ünlü, A., 2013. Patates Y virüsü (Potato Virus Y = PVY)'ne dayanıklı sivri biber hatlarının geliştirilmesi. *Derim*, 30 (2), 42-53.
- Clark, M.F., Adams, A.N., 1977. Characteristics of microplate method of Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses, *Journal of General Virology*, 34, 475-483.
- Deligöz, İ., Sökmen, M., 2020. Samsun ilinde biber alanlarında enfeksiyon oluşturan Potato virus Y-patotiplerinin belirlenmesi ve moleküler karakterizasyonu." *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi* 35.3: 483-495.
- Dogimont, C., Palloix, A., Daubze, A.M, Marchoux, G., Selassie, K.G., Pochard, E., 1996. Genetic analysis of broad spectrum resistance to potyviruses using doubled haploid lines of pepper (*Capsicum annum* L.), *Euphytica* 88, 231–239.
- Echer, M., Costa, C.P., 2002. Reaction of sweet pepper to the Potato Virus Y (PVYm)1, *Scientia Agricola*, 59 (2), 309-314.
- FAO, 2022. Food and Agriculture Organization of the United Nations. www.fao.org. URL: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize> (Erişim:27.05.2022).
- Gebre-Selassie, K., Marchoux, G., Delecolle, B., Pochard, E., 1985. Variabilite naturelle des souches du virus Y de la pomme de terre dans les cultures de piment du Sud- Est de la France. *Caracterisation et classification en pathotypes*. *Agronomie*, 5 (7): 621-630.
- Greenleaf, W.H., 1986. Pepper breeding, 67-134. In 'Breeding Vegetable Crops', A.V.I., 67-127.
- Hamalainen, J.H., Watanabe, K.N., Valkonen, J.P.T., Arihara, A., Plaisted, R.L., Pehu, E., Miller, L., Slack, S.A., 1997. Mapping and marker-assisted selection for a gene for extreme resistance to Potato virus Y, *Theoretical and Applied Genetics*, 94, 192-197.
- Karataş, K., Arpacı, B.B., Buzkan, N., Tekik, A., 2017. Bazı Kırmızıbiber Hatlarının Patates Y Virüs

- (Potato Virus Y, Pvy) Patotiplerine Reaksiyonları. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 34 (2), 65-73.
- Kerlan, C., Moury, B., 2008. Potato Virus Y. In Encyclopedia of Virology, 287-296. Edited by B.W.J. Mahy & M.H.V. van Regenmortel. Oxford: Academic Press.
- Kyle, M.M, Palloix, A., 1997. Proposed revision of nomenclature for Potyvirus resistance genes in Capsicum, Euphytica, 97, 183–188.
- Moodley V., Naidoo, R., Gubba, A., Mafongoya, P.L., 2019. Development of Potato virus Y (PVY) resistant pepper (Capsicum annum L.) lines using marker-assisted selection (MAS). Physiological and Molecular Plant Pathology, 105, 96-101.
- Özkaynak, E., Devran, Z., Kahveci, E., Doğanlar, S., Başköylü, B., Doğan, F., İşleyen, M., Yüksel, A., Yüksel, M. 2014. Pyramiding multiple genes for resistance to PVY, TSWV and PMMoV in pepper using molecular markers. European Journal of Horticultural Science 79(4):233-239.
- Pasko, P., Luis Arteaga, M., Gil Ortega, R., 1992. Different kinds of reactions to PVY-1-2 in Capsicum annum L. cv 'SCM-334'. Proc 8th Eucarpia Meet Genet Breed Capsicum Eggplant, 153–156.
- Palloix A., 1992. Diseases of pepper and perspectives for genetic control. EUCARPIA. VIIIth Meeting 'Genetics and Breeding on Capsicumand Eggplant', Rome, Italy, 7-10 Sept. 1992,120-126.
- Palloix, A., Abak, K., Gognalons, P., Daubeze, A.M., Güldür, M.E., Memouchi, G., Selassie, K.G., 1994. Virus diseases infecting pepper crops in Türkiye. 9th Congress of the Mediteranean Phytopathological Union, September 18-24, Kuşadası-Aydın, Türkiye, 469-472.
- Kurt Polat, P. Ö., Yağdı, K., 2021. Bazı ekmeklik buğday genotiplerinde SSR (Mikrosatalit) markörü kullanılarak kahverengi pas dayanıklılık geni Lr10'un belirlenmesi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi, 24(4), 850-858.
- Robaglia, C., Caranta, C., 2006. Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection, Trends in Plant Science, 11, 40-45.
- Rubio, M., Caranta, C., Palloix, P., 2008. Functional markers for selection of Potyvirus resistance alleles at the pvr2-eIF4E locus in pepper using tetra-primer ARMS-PCR, Genome, 51, 767-771.
- Ruffel, S., Dussault, M.H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C., Caranta, C., 2002. A natural recessive resistance gene against Potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E), Plant Journal, 32, 1067–1075.
- Ruffel, S., Caranta, C., Palloix, A., Lefebvre, V., Caboche, M., Bendahmane, A., 2004. Structural analysis of the eukaryotic initiation factor 4E gene controlling Potyvirus resistance in pepper: exploitation of a BAC library. Gene, 338 (2), 209-2016.
- Ruffel, S., Gallois, J., Moury, B., Robaglia, C., Palloix, A., Caranta, C., 2006. Simultaneous mutations in translation initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E are required to prevent Pepper veinal mottle virus infection of pepper. Journal of General Virology. 87, 2089–2098.
- Shopan, J., Lv, X., Hu, Z., Zhang, M., Yang, J., 2020. Eukaryotic Translation Initiation Factors Shape RNA Viruses Resistance in Plants. Horticultural Plant Journal, 6(2), 81-88.
- Varveri, C., 2000. Potato Y potyvirus detection by immunological and molecular techniques in plants and aphids. Phytoparasitica. 28: 141-148.
- Yeken, M. Z., Özer, G., Çelik, A., & Çiftçi, V., 2018. Türkiye'de ticari fasulye (Phaseolus vulgaris L.) çeşitlerinde bean common mosaic virus ve bean common mosaic necrosis virus etmenlerine dayanıklılıkla ilişkili genlerin karakterizasyonu. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 5(4), 613-619.