



Biber hafif benek virüs'üne (PMMoV) karşı L4 dayanıklılık durumunun taranması ve moleküler yöntemlerle karakterizasyonu

Screening of L4 resistance status to pepper mild mottle virus (PMMoV) and characterization by molecular methods

Hakan FİDAN^{id}, Murat BARUT^{id}

Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Antalya

Sorumlu yazar (Corresponding author): H. Fidan, e-posta (e-mail): hakanfidan@akdeniz.edu.tr

Yazar(lar) e-posta (Author e-mail): murab07@gmail.com

MAKALE BİLGİSİ

Alınış tarihi 19 Temmuz 2019
Düzeltilme tarihi 05 Eylül 2019
Kabul tarihi 05 Eylül 2019

Anahtar Kelimeler:

L4 geni
Dayanıklılığın kırılması
Biber
Biber hafif benek virüsü
PMMoV

ÖZ

Biber hafif benek virüsü (*Pepper mild mottle virus*- PMMoV) *Tobamovirüs*ler içerisinde yer alan dünya genelinde biber üretim alanlarında en sık karşılaşılan virüslerden biridir. Bu virüs çoğu zaman hasat dönemine kadar gizli kalabilmekte ve en büyük zararlarını hasat döneminde meyveler üzerinde meydana getirebilmektedir. Bölgemizde son yıllarda biber üretim alanlarında sıklıkla karşılaşılan bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Dünyanın farklı bölgelerinde L4 geni vasıtasıyla sağlanan dayanıklılığı kıran virüs izolatının rapor edilmesi, ülkemizde de PMMoV'nin epidemisi durumunun araştırılması gerekliliğini ortaya koymuştur. L4 dayanıklılığının etkinliğini belirleyebilmek için bölgemizden biber üretim alanlarında PMMoV ile şüpheli örnekler toplanmıştır. RT-PCR tekniği ile doğrulanan bu örnek PMMoV-Kum olarak kodlanmıştır ve Gen bankasına kaydı yapılarak erişim numarası (MK806437) alınmıştır. PMMoV-Kum izolatı 1 hassas (B1) ve 5 dayanıklı (L4B1, L4B2, L4B3, L4B4, L4B5) bitkilerine mekanik inokulasyon yöntemi ile bulaştırılmıştır. Yapılan fenotipik gözlemler neticesinde PMMoV-Kum izolatının L4 genine bağlı dayanıklılığı kıramadığı biyolojik testler ile doğrulanmıştır. Dayanıklı olarak seçilen bitkiler üzerinde herhangi bir PMMoV simptomunun oluşmaması üzerine en başarılı çalışan L4 markırlarını belirlemeye yönelik primerlerin belirlenmesi tez çalışmasının seyrini belirlemiş ve en başarılı markırın AP-7/AP-8 ve P118/119 primer çiftleri olduğu tespit edilmiştir.

ARTICLE INFO

Received 19 July 2019
Received in revised form 05 September 2019
Accepted 05 September 2019

Keywords:

L4 gene
Resistance Breaking
Pepper
Pepper mild mottle virus
PMMoV

ABSTRACT

Pepper mild mottle virus (PMMoV) is one of the most common *Tobamoviruses* can be found in worldwide. This virus has potential to cause economic losses and has kept secret infections until harvest time causing great damages on pepper fruits at this period. During 2016-2019 production periods, it has been frequently seen in pepper grown areas. Several isolates reported from different regions of the world regarding resistance with L4 gene fights against this virus disease. In this study, we aimed to investigate how the PMMoV increased and understood its incidence pepper grown areas in Turkey. In order to determine the effectiveness of L4 resistance, PMMoV and other suspected pepper samples were isolated. The collected samples were studied by RT-PCR technique using PMMoV-Kum isolate and its gene bank's access number (MK806437) was registered. A sensitive (B1) and 5 resistant (L4B1, L4B2, L4B3, L4B4, L4B5) plants were mechanically inoculated with the PMMoV-Kum isolate and their phenotypic observations were recorded. The PMMoV-Kum isolate was confirmed as avirulent in biological tests, the PMMoV could not overcome L4 gene mediated resistance. Furthermore, a successful primer set has determined as AP-7 / AP-8 in L4 gene mediated resistance against occurrence of any PMMoV symptoms on the tested plants. Determining new PMMoV isolates which break the L4 gene mediated resistance, phylogenetic analyzes was performed to determine its place among the world's isolates.

1. Giriş

Biber (*Capsicum annuum* L.) dünyada en yaygın olarak üretilen ve tüketilen aynı zamanda ekonomik olarak önemli yere sahip sebze gruplarından biridir. FAO 2017 yılı verileri incelendiğinde dünya genelinde 34655.814 ton biber üretimi yapıldığı rapor edilmiştir (FAOSTAT 2018). Ülkemizde de yoğun olarak tarımı yapılan biber bitkisi TÜİK 2018 verileri temel alındığında, Antalya ve ilçelerinin toplam 439.255 ton ile ilk sırada yer aldığı görülmektedir. Biber ülkemizde Salçalık-Kapya, Dolmalık, Sivri ve Charleston çeşitleri olarak üretimi gerçekleştirilmekte olup, bu ürün grupları içerisinde 187.311 ton ile Sivri çeşidi en fazla üretimi yapılan biber çeşidi olarak karşımıza çıkmaktadır (TÜİK 2018).

Biber yetiştiriciliği yapılan açık alan ve seralarda üretim verilerini sınırlandıran birçok faktör karşımıza çıkmaktadır. Biber yetiştiriciliği yapılan alanlarda hem kaliteyi hem de üretim miktarını etkileyen en önemli parametrelerin başında virüs hastalıkları gelmektedir (Anandakumar ve ark. 2008). Üretim alanlarında en sık karşılaşılan vektörler; yaprak bitleri (*Myzus persica*), thripsler (*Thrips tabaci*, *Frankliniella occidentalis*) ve beyazsinekler (*Bemisia tabaci*) olarak bilinmektedir ve bu vektörler önemli verim kayıplarına sebep olan virüslerin taşınımında etkin rol oynamaktadır. Bazı araştırmacılar biber üretim alanlarında sık rastlanan ve önemli olan ilk üç virüs olarak; *Potato virus Y* (PVY), *Tomato Spotted wilt virus* (TSWV) ve *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) olduğunu belirtmişlerdir (Kim ve ark. 2008; Jancz ve ark. 2009; Scholthof ve ark. 2011). Fakat, Biber hafif benek virüsü'nün de (PMMoV) dahil olduğu *Tobamovirus*lerin bilinen bir vekörü olmamasına rağmen temas ile bulaşabilmeleri nedeniyle üretim alanlarının en büyük sorunları olarak karşımıza çıkmaktadır. Virüs hastalıkları ile mücadelede en başarılı yönetim modeli, dayanıklı çeşitlerin ıslahı ve bu hastalıklara vektörlük yapan böceklerle karşı kültürel-kimyasal mücadele yöntemlerinin kullanılmasıdır. Birçok virüs vektörü ile kimyasal-kültürel mücadeleler yapılarak hastalık kontrol altında tutulabilmektedir. Fakat daha büyük sorun ise, *Tobamovirus*ler gibi temas yoluyla bile rahatlıkla bulaşabilen ve şu ana kadar vektörü tespit edilmeyen ya da edilemeyen virüslerin varlığıdır. Virülenliği çok yüksek olan bu virüslerin mücadelesi bir o kadar zor olmaktadır.

Son zamanlarda hem üreticiler ve hem de ıslah firmaları tarafından, PMMoV ile ilgili şikâyetlerin arttığı tespit edilmiştir. Yürütülen çalışmamız bu çalışma ile de bu şikâyetlerin nedenleri ve *L4* ile sağlanan dayanımın kırılıp kırılmadığının tespit edilmesi yolu izlenmiştir. Kimyasal, fiziksel ve kültürel yöntemler, PMMoV kontrolünde bir yere kadar başarı sağlayabildiği için, dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi en önemli kontrol stratejisi olarak kabul edilmektedir. *Tobamovirus*lere karşı dayanıklılıkta kullanılan *L* lokusu *Capsicum* türlerinin yabani ve kültür formları, *Capsicum annuum* (*L1*), *Capsicum frutescens* (*L2*), *Capsicum chinense* (*L3*) ve *Capsicum chacoense* (*L4*) de bulunmuştur (Boukema 1980; Berzal-Herranz ve ark. 1995). PMMoV'ye karşı dayanıklılık *L1*'den *L4*'e kadar sıralanabilen 4 adet dayanıklılık geni tarafından sağlanmaktadır (Boukema 1984). *L* genleri aracılığı ile *Tobamovirus*lerin P0, P1, P1.2 veya P1.2.3 patotipleri üzerinde dayanıklılık sağladığı belirlenmiştir (Csillery ve ark. 1983; Pereszny ve ark. 2003; Wetter ve ark. 1984). P0 patotipine ait virüsler, herhangi bir *L* geni taşıyan bitkilere bulaşamaz. Benzer bir şekilde virüslerin ait olduğu P1, P1.2 ve P1.2.3 patotipleri sistematik olarak sırasıyla *L1* ve *L1a* genlerini; *L1* ve *L2* genlerini ve *L1* ile *L3* genlerini enfekte edebilmektedir (Sawada

ve ark. 2005). Bu sınıflandırmaya uygun olarak da dünyada bulunan PMMoV izolatları P1.2 veya P1.2.3 olarak adlandırılmıştır (Rast 1988). *L3* genini taşıyan bitkiler patotip P1.2'ye dayanıklıdır, fakat P1.2.3'e karşı hassastır (Matsunaga ve ark. 2003). Aksine, *L4* genine sahip bitkiler her iki patojene karşıda dayanıklıdır (Matsunaga ve ark. 2003; Kim ve ark. 2008).

Ülkemizde de *Tobamovirus*lere karşı dayanıklılık da *L3* ve *L4* genleri etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Yoğun biber tarımı yapılan alanlarda PMMoV ile karşılaşılması sonucunda bu gen vasıtasıyla dayanıklılığın kırılıp kırılmadığı akıllarda soru işaretleri oluşturmaktadır. Yürütmüş olduğumuz bu çalışma ile üretim alanlarında kullanılan biber çeşitleri üzerinde *L4* genlerinin varlığı moleküler markırlar yardımıyla belirlenmiştir. *L4* geni içeren bitkilerde PMMoV mekanik olarak bulaştırılmış ve *L4* dayanıklılığının kırılmadığı belirlenmiştir. *L4* geni kullanılarak yürütülen ıslah çalışmalarında araştırmacılara başarılı bir yol haritası sağlamak amacıyla rapor edilen markırlar denenmiştir. Gerçekleştirmiş olduğumuz çalışma ile hem *L4* geninden kaynaklı dayanıklılığın kırılmadığı belirlenmiş ve bu genin varlığının tespitinde en başarılı şekilde sonuç veren moleküler markırın tespiti yapılarak araştırmacılara sunulması hedeflenmiştir.

2. Materyal ve Metot

Yürütülen çalışma esnasında kullanılan PMMoV izolatı Antalya bölgesinde yoğun biber tarımının yapıldığı Kumluca ilçesinde bulunan seralardan temin edilmiştir. PMMoV izolatının *L4* geni vasıtasıyla sağlanan dayanıklılığının üstesinden gelip gelmediğini belirleyebilmek için 1 adet hassas (*B1*) ve 5 adet ticari olarak *L4* geni barındırdığı beyan edilen çeşit (*L4B2*, *L4B3*, *L4B4*, *L4B5*, *L4B6*) test bitkisi olarak kullanılmıştır. Bitkilere deneme süresi boyunca 7 gün aralıklarla thrips, beyazsinek, kırmızı örümcek ve yaprakbiti ilaçları uygulanmıştır. Sulama suyu olarak 18.18.18+2Mg+ME gübreli su kullanılmıştır. Deneme hem serada hem de iklim odasında 5 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Denemeler esnasında sera içinde herhangi bir suni ışıklandırma veya ısıtma yapılmamıştır. İklim odasında ise bitkiler flüoresan lambalarla ışıklandırılmış (16 saat aydınlık, 8 saat karanlık) ve iklim odasının sıcaklığı 25°C'de tutulmuştur.

Biberler üzerinde PMMoV'ye karşı mücadelede en etkin yöntem *L4* geninin kullanılması ve etkin bir biçimde moleküler markırlar ile belirlenebilmesidir. *L4* geninin varlığını tespit edebilmek için DNA ekstraksiyonu GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon çalışması sonucunda elde edilen DNA'ların konsantrasyonları belirlenmiştir. Her bir örnek için PCR bileşenleri için; DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, K1081, Germany), 11 µl, Forward primer 1.0 µM, Reverse primer 1.0 µM, Template DNA 10 pg - 1 µg, steril distile su 11 µl olarak belirlenmiştir. Bu amaç doğrultusunda 6 test bitkisi, biberde *L4* geninin tespitinde yayınlanmış ve kabul gören primerler; *L4SC340* (Kim ve ark. 2008), *AP-7/AP-8* (Matsunaga ve ark. 2003), *060I2END-087H3T7* (Yang ve ark. 2009), *P118/P119* (Lefebvre ve ark. 2002) ile test edilmiştir. Kullanılan primerlere ait bilgiler Çizelge 1'de verilmiştir.

Yürütülen çalışma sırasında kullanılan biber bitkileri Akdeniz Üniversitesi Fitopatoloji seralarında muhafaza edilmiştir. Mekanik inokulasyon çalışmaları için %0.1 2-mercaptopethenol içeren 0.02 M Fosfat tampon çözeltisi (pH: 7)

Çizelge 1. *L4* dayanımını belirlemek için kullanılan primerlere ait bilgiler.**Table 1.** Information on primers used to determine *L4* gene.

Marker	Primer İsmi	Primer dizilimi 5' 3'	Boyut(Bç)	Annelig
087H3T7	087H3T7F	CCTTTGCCTGCATTATTCTTG	440	62
	087H3T7R	GCCCAAATTTATTCCCAAATGC		
060I2END	060I2END-2F	GCACATCAGCAGGTTTAGTACG	751	62
	060I2END-2R	CCAACTGTCAAACCTCGG		
L4SC340	L4SC340F	AAGGGGCGTTTCTTGAGCCAA	340	53
	L4SC340R	TCCATGGAGTTGTTCTGCAT		
AP-7/AP-8	AP-7	CGTACTGTGGCTCAAAACTC	1400	58
	AP-8	ATTCGCACCGTTTAGCCCGT		
P118/P119	P118	AATCCTCAACTGCCATTC	350	58
	P119	ATTGGGACATGAGGTGTGTA		

1:5 (w/v) oranında kullanılmıştır. PMMoV izolatu porselen havanda ezilmiştir. Bitkilerin farklı sıcaklık ve ortamlarda virüse karşı gösterdikleri dayanıklılık cevaplarını inceleyebilmek için bitkiler üzerinde farklı dönemlerde mekanik inokulasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Her dönem için bitkilere 5'er kez mekanik inokulasyon işlemi yapılmıştır. Simptomların hassas çeşitler üzerinde gelişmesiyle birlikte virüsün varlığını doğrulayabilmek adına RT-PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

L4 geninin varlığı moleküler olarak karakterize edildikten sonra bu bitkilerden yaprak örnekleri alınarak RT-PCR çalışmalarında kullanabilmek için Thermo Scientific- RNA izolasyon kiti (Thermo Scientific, K0731, Germany), ile bitkilerden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA'lar spektrofotometrede optimize edilerek (A260/280 1.8-2.0) konsantrasyonları 200 ng/µl olacak şekilde ayarlanmıştır. RNA optimizasyonu yapıldıktan sonra Thermo Scientific Verso 1-Step RT-PCR Kit ReddyMix kullanılarak tek aşamalı RT-PCR (One Step RT-PCR) çalışmaları yürütülmüştür. Her bir örnek için RT-PCR bileşenleri, Verso Enzim Mix 0.5 µl, 2X-1-Step PCR ReddMix* 12.5 µl, RT Enhanser 1.25 µl, Forwrd primer 1 µl, Reverse primer 1 µl, RNA 2 µl, ddH₂O 6.25 µl toplamda 25 µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Simptomların sadece PMMoV'ye ait olduğunun tespit edilebilmesi için Fidan ve Sarı (2019)'a göre üretim alanlarında en sık rastlanan virüs hastalıklarına karşı RT-PCR çalışmaları yapılmış ve elde edilen izolatan sadece PMMoV olduğu doğrulanmıştır. Elde edilen RT-PCR ürünleri %1.5 lik agaroz jel de yürütülmüş Ethidium bromide ile boyandıktan sonra Biometra jel görüntüleme cihazında UV altında görüntülenmiştir.

Velasco ve ark. (2002) PMMoV'yi tanılamak amacıyla geliştirdikleri primerleri kullanılarak PMMoV-Kum izolatının replikasyon proteini üzerindeki 4015-4807 aralığının (183 kDa bölgesi) ampifikasyonu yapılarak genom bilgileri elde edilmiştir. Elde edilen veriler soy ağacının oluşturulması aşamasında kullanılmıştır. Bu amaçla RT-PCR'da 50 µl hacimde çalışılarak 10 µl 'lik hacim jelde yürütülmüş ve 40 µl'lik kalan kısmı dizileme hizmeti almak için gönderilmiştir. Dizilemede Sentebiolab firmasından hizmet alımı gerçekleştirilmiştir. Dizileme sonucunda elde edilen veriler CHROMAS v.2.6.4 (Technelysium Pty. Ltd.), BIOEDIT v.7.2.5 (Hall 1999) ve Mega7 (Kumar ve ark. 2011) programları kullanılarak analiz edilmiştir. CHROMAS programı ile yaklaşık 806 bp uzunluğunda olan ürünlerin forward ve reverse dizilerinin baş ve son kısımlarındaki okuma kirlilikleri silinmiştir. Daha sonra forward ve reverse dizileri BIOEDIT programında üst üste denk getirilerek okuma doğrulanmış ve olası baz kaymaları düzeltilmiştir. Çalışmaya ait olan tüm

hizalama (alignment) ve filogenetik analizler MEGA7 programı ile yapılmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

Biber hafif benek virüsü (PMMoV) biber üretim alanlarında ekonomik anlamda zarar meydana getiren en önemli virüslerden biridir. Yapılan bu çalışma ile de PMMoV'ye karşı *L4* vasıtasıyla sağlanan dayanıklılık durumları belirlenmeye çalışılmıştır. *L4* genin aktivasyonunu belirleyebilmek için 1 hassas (B1) ve 5 adet ticari olarak *L4* geni barındırdığı beyan edilen çeşit (L4B2, L4B3, L4B4, L4B5, L4B6) test bitkisi olarak kullanılmıştır. Bitkiler üzerinde *L4* geninin varlığının tespit edilmesi için; yayınlanmış ve kabul gören primerler; L4SC340 (Kim ve ark. 2008), AP-7/AP-8 (Matsunaga ve ark. 2003), 060I2END- 087H3T7 (Yang ve ark. 2009), P118/P119 (Lefebvre ve ark. 2002) kullanılmıştır ve Şekil 1'de PCR çalışmasının sonuçları paylaşılmıştır. Yapılan analizler doğrultusunda AP-7/AP-8 primerlerinin *L4* dayanımını belirlemede en güvenilir sonucu veren primer çifti olduğu tespit edilmiştir.

Test bitkilerinin PMMoV'ye karşı tepkilerinin belirlenmesi amacıyla virüs, bitkilere mekanik inokulasyon yöntemi kullanılarak bulaştırılmıştır. Bulaştırma sonucunda elde edilen bulgular doğrultusunda *L4* geninin PMMoV'a karşı dayanıklılık durumları fenotipik ve genotipik gözlemler kullanılarak belirlenmiştir. Bitkilerde ilk belirtiler hassas çeşitlerde gözlemlenmiştir ve *L4* geni var olduğu beyan edilen çeşitlerde ise HR (hipersensitif reaksiyon)'lar ortaya çıkmıştır. Farklı dönemlerde kurulan denemelerde PMMoV-Kum izolatu sadece hassas çeşit olarak seçilen B1 bitkisi üzerinde sistemik enfeksiyonlar oluştururken, *L4* geni içeren çeşitler üzerinde herhangi bir sistemik enfeksiyon meydana getirmediği belirlenmiştir (Şekil 2).

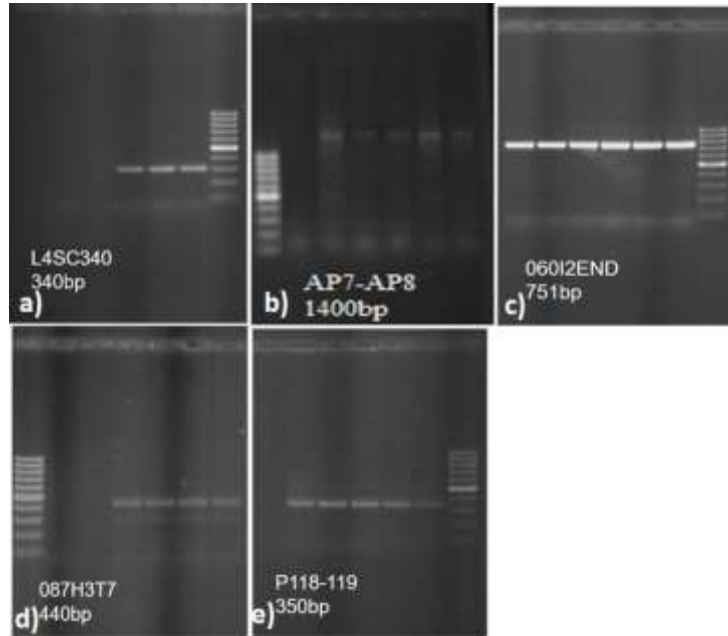
L4 genin farklı sıcaklıklarda verdiği reaksiyonlarının da belirlenebilmesi amacıyla bu deneme 5 farklı dönemde; biber bitkilerinin farklı ortamlarda (iklimlendirme odaları ve sera) ve farklı sıcaklık dönemlerinde (ilkbahar, yaz, sonbahar ve kış periyodlarında) PMMoV enfeksiyonlarına karşı verdikleri tepkiler belirlenmiştir. Bu amaç doğrultusunda oluşturulan plan Çizelge 2'de ve bitkilerin her dönem PMMoV izolatu ile enfekteli olma durumu Şekil 3'de paylaşılmıştır.

PMMoV son yıllarda biber üretim alanlarında büyük problemler oluşturmaktadır. Özellikle Çağlar ve ark. (2012)'nın yılında yapılan çalışmada *L3* geni vasıtasıyla PMMoV için sağlanan dayanıklılığın kırılmasının rapor edilmesiyle birlikte bu hastalık ile mücadelede kullanılacak tek dayanıklılık kaynağı olarak *Capsicum chacoense*'den elde edilen *L4* geni üzerinden

çalışmalara devam edilmiştir. *L4* geni vasıtasıyla sadece PMMoV'ye karşı değil aynı zamanda *Tobamovirus* grubuna ait ToMV, TMV gibi diğer virüslere karşı dayanıklılık sağlanabildiği belirtilmiştir (Boukema 1984). *L4* gen aktivitesinin kırılmış olma ihtimali bu virüslere karşı elimizdeki en güçlü silahımızı kaybedebileceğimiz anlamına gelmektedir. Bu yüzden *L4* gen aktivitesini belirlemeye yönelik en başarılı moleküler markırın tespit edilmesi, PMMoV'nin bitkiler üzerinde oluşturdukları reaksiyonlar ile birlikte değerlendirilmesi *L4* geninden sağlanan dayanıklılığın kırılıp kırılmadığı konusundaki şüpheleri aydınlatmanın en önemli adımını oluşturmaktadır.

L4 geni içeren test bitkilerinin PMMoV izolata gösterdiği tepkiler çalışma dönemi boyunca hem fenotipik hem de genotipik kriterlere göre değerlendirilmiştir. Bitkilerin sergilemiş oldukları fenotipik ve genotipik reaksiyonlar birleştirildiğinde geriye belirlenmesi gereken bir diğer konu *L4* genini en iyi belirleyen markırların tespitidir. Bunun için daha

önceden rapor edilmiş olan L4SC340, AP-7/AP-8, 060I2END, 087H3T7, P118/P119 markırları seçilerek en doğru yanıt veren markır belirlenmeye çalışılmıştır. Test bitkilerinin PMMoV'e karşı gösterdikleri tepkiler 5 farklı deneme kurularak gözlemlenmiştir ve her deneme sonucunda *L4* geni içeren bitkilerin PMMoV ile bulaşmadığı hassas çeşitlerin ise PMMoV ile bulaştığı doğrulanmıştır. *L4* genin dayanıklılık yanıtlarının çok yüksek olduğu birçok araştırmacı tarafından rapor edilmesi ve Antalya bölgesinde PMMoV'ye ait şikâyetlerin artması neticesinde bizleri en doğru sonuca ulaştıracak olan moleküler markır bulmaya yönlendirmiştir. Bu amaç doğrultusunda 6 test bitkisine, biberde *L4* geninin tespitinde yayınlanmış ve kabul gören primerler; L4SC340 (Kim ve ark. 2008), AP-7/AP-8 (Matsunaga ve ark. 2003), 060I2END- 087H3T7 (Yang ve ark. 2009), P118/P119 (Lefebvre ve ark. 2002) ile test edilmiştir ve sonuçlar mekanik inokulasyon sonuçları ile birleştirilmiştir. Moleküler markırlar ve klasik test sonuçları Çizelge 3'de özetlenmeye çalışılmıştır.



Şekil 1. *L4* primerlerine ait jel görüntüleri, a) L4SC340 primerine ait jel görüntüsü, b) AP7-AP8 primerine ait jel görüntüleri, c) 060I2END primerine ait jel görüntüsü, d) 087H3T7 primerine ait jel görüntüsü, e) P118-P119 primerlerine ait jel görüntüsü.

Figure 1. Gel images of *L4* primers, a) Gel image of L4SC340 primer, b) Gel images of AP7-AP8 primer, c) Gel image of primer 060I2END, d) Gel image of primer 087H3T7, e) Primers of P118-P119 gel image.



Şekil 2. Mekanik inokulasyon sonrasında bitkilerde meydana gelen semptomlar; a) Test bitkilerine mekanik inokulasyon işlemi b) *L4* geni bulunan çeşitlerde meydana gelen hipersensitif reaksiyonlar c) Hassas bitkiler üzerinde meydana gelen ilk semptomlar.

Figure 2. Symptoms in plants after mechanical inoculation; a) Mechanical inoculation to test plants b) Hypersensitive response in varieties with *L4* gene c) Initial symptoms on susceptible plants.

Çizelge 2. PMMoV-Kum izolatu için oluşturulan deneme planı.**Table 2.** Test plan for PMMoV-Kum isolate.

Deneme Sayısı	Deneme Süresi	Ortalama Sıcaklık	İnokulasyon Tarihleri	Moleküler Test Tarihleri	Yer
I	Bş:23.09.18 Bt:01.12.18	15.8°C	I:24.09.17 II:04.09.17 III:14.10.17 IV:25.10.17 V:05.11.18	10.12.18	Sera
II	Bş:10.01.18 Bt:25.03.18	11.2°C	I:12.01.18 II:21.01.18 III:03.02.18 IV:13.02.18 V:23.02.18	27.03.18	Sera
III	Bş:01.04.18 Bt:27.07.18	25-28°C	I:02.04.18 II:05.04.18 III:15.04.18 IV:25.04.18 V:06.05.18	13.07.18	İklimlendirme Odası
IV	Bş:01.07.18 Bt: 25.10.18	25-28°C	I:02.07.18 II:06.07.18 III:14.08.18 IV:27.08.18 V:05.10.18	24.10.19	İklimlendirme Odası
V	Bş:02.11.18 Bt:30.03.19	11.3°C	I:03.11.18 II:08.11.18 III:18.11.18 III:01.01.19 IV:11.01.19 V:21.01.19	25.03.19	Sera

Çizelge 3. 6 adet biber çeşidinin 5 farklı primer kombinasyonuna ait PCR çalışması sonuçları. (+, turkuaz) *L4* var, (-, gri) *L4* yok.**Table 3.** PCR amplification results of 5 different primer combinations of 6 pepper varieties. (+, turquoise) *L4* exists, (-, gray) *L4* absent.

Primer / Biber Çeşidi	B1	L4B2	L4B3	L4B4	L4B5	L4B6
L4SC340	-	-	-	+	+	+
AP-7/AP-8	-	+	+	+	+	+
060I2END	+	+	+	+	+	+
087H3T7	-	-	+	+	+	+
P118/P119	-	+	+	+	+	+

Çalışma esnasında elde etmeyi istediğimiz önemli verilerden biri *L4* geninin varlığını en doğru şekilde bize sunan moleküler markırları belirleyebilmektir. Bu verilerin elde edilmesi *L4* geni kullanılarak yürütülen dayanıklılık ıslahı çalışmalarında araştırmacılara büyük kolaylık sağlayacaktır. Aynı zamanda da *L4* dayanımının etkili bir şekilde devam edip etmediğinin belirlenmesine yönelik bir adımı oluşturmaktadır. Bu amaç için *L4* geni içeren ve içermeyen bitkilerin PMMoV'ye karşı gösterdikleri tepkiler belirlenmiştir. *L4* geni içeren bitkiler PMMoV enfeksiyonlarına HR yanıtları ile karşı koyarak enfeksiyonu önlemesi bu genin aktivitesinin hala sağlandığını bizlere göstermiştir. L4B2, L4B3, L4B4, L4B5 bitkileri üzerinde herhangi bir PMMoV enfeksiyonu meydana gelmediği hem gözlemlerle hem de RT-PCR sonuçları ile doğrulanmıştır. B1 bitkisinde ise PMMoV enfeksiyonuna ait belirtiler hem gözle görülür şekilde fark edilmiş hem de RT-PCR sonuçları ile bu belirtilerin sadece PMMoV ait olduğunu doğrular nitelikte olmuştur. Bu veriler doğrultusunda moleküler markırlarında L4B2, L4B3, L4B4, L4B5 bitkilerinin *L4* genini içerdiği B1 bitkilerinin ise *L4* geninden yoksun olduğu sonucunun elde edilmesi gerekmektedir. *L4* geni için denenen 5 primer çiftinden sadece P118/P119 ve AP-7/AP-8 primer çiftleri elde ettiğimiz fenotip verileri ile birebir uyduğu sonucuna varılmıştır. *L4* geni bulunmayan B1 çeşidinde, 060I2END primerine göre pozitif sonuç vermesinin yanıltıcı olabileceği belirlenmiştir. Ayrıca *L4* geni bulunduğu emin

olduğumuz L4B2 ve L4B3 çeşitleri içinde, L4SC340 primerine göre negatif sonuç verip, AP-7/AP-8 primerine göre pozitif sonuç vermesi de bu iki primerin birbirleri ile tutarlı sonuçlar vermediği dolayısıyla da anlam karmaşasına yol açabileceği düşünülmektedir. Elde edilen bu bulgular, *L4* geninin kırılıp kırılmadığı tartışmasına verilebilecek cevabı bizlere sunmaktadır. Başarı oranı düşük olan markırların kullanılması *L4* gen varlığının bitkilerde yanlış belirlenmesine, dolayısıyla *L4* geni bulunmayan çeşitlerin arazi denemelerinde, PMMoV ile enfekteli bitkilerin var olmasına neden olmuştur. Yanlış primer kullanımının ülkemiz için; emek, zaman ve kaynak israfına yol açtığı unutmamak gerekir. Bu primerlerin birbirleri ile neden tutarlı cevaplar vermediğinin irdelenmesi de başka bir çalışma ile aydınlatılması gerekmektedir.

Moleküler markırların başarısını etkileyen unsurlardan biri de bu primerlerin aday gen olan *L4* genine ne kadar yakınlıkta konumlandığı bilgisidir. Denemede kullanılan L4SC340 *L4* genine 1.8 cM yakınında konumlandığı (Kim ve ark. 2008), AP-7/AP-8 primerlerinin *L4* genine olan yakınlığının 1.5 cM yakınında olduğu (Matsunaga ve ark. 2003), 087H3T7 primerinin ise gene olan uzaklığının 0.7 cM yakınında konumlandığı rapor edilmiştir (Yang ve ark. 2009). Bu araştırmacıların verileri dikkate alındığında en başarılı primerin Yang ve ark. (2009) yılında geliştirdikleri 087H3T7 primeri olması beklenmektedir. Buna karşılık kurmuş olduğumuz beş deneme ve bitkilerin PMMoV ile bulaşık olma durumları



Şekil 3. PMMoV inokulasyonunun farklı dönemlerde ve farklı ortamlarda mekanik inokulasyonuna ait veriler; a) 23.09.18-01.12.18 tarihleri arasında kurulan deneme, b) 23.09.18-01.12.18 denemesinde kullanılan test bitkilerinin PMMoV ile enfekteli olduğuna ait RT-PCR sonuçları, c) 10.01.18-25.03.18 tarihleri arasında kurulan deneme, d) 10.01.18-25.03.18 denemesinde kullanılan test bitkilerinin PMMoV ile enfekteli olduğunun RT-PCR ile doğrulanması, e) 01.04.18-27.07.28 tarihleri arasında kurulan deneme, f) 01.04.18-27.07.28 denemesinde kullanılan test bitkilerinin PMMoV ile enfekteli olma durumunun RT-PCR ile doğrulanması, g) 01.07.18-25.10.18 tarihlerinde kurulan deneme, h) 01.07.18-25.10.18 tarihlerinde kullanılan test bitkilerinin PMMoV ile enfekteli olma durumunun RT-PCR ile doğrulanması, ı) 02.11.19-30.03.19 tarihinde kurulan deneme, j) 02.11.19-30.03.19 tarihleri arasındaki denemede kullanılan test bitkilerinin PMMoV ile enfekteli olma durumunun RT-PCR ile doğrulanması.

Figure 3. Data of mechanical inoculation of PMMoV inoculation at different periods and in different environments; a) The experiment established between 23.09.18-01.12.18, b) RT-PCR results showing that the test plants used in the experiment 23.09.18-01.12.18 were infected with PMMoV, c) The experiment established between 10.01.18-25.03.18 d) Confirmation that the test plants used in the 10.01.18-25.03.18 experiment were infected with PMMoV by RT-PCR, e) the experiment established between 01.04.18-27.07.28, f) the test used in the experiment 01.04.18-27.07.28 Verification of PMMoV-infected plants by RT-PCR, g) Trial established on 01.07.18-25.10.18; J) Verification of PMMoV infection of test plants used in the experiment between 02.11.19-30.03.19 by RT-PCR.

değerlendirildiğinde en başarılı primerin [Matsunaga ve ark. \(2003\)](#)'da geliştirdikleri AP-7/AP-8 primeri olduğu belirlenmiştir. 087H3T7 primerinin kurmuş olduğumuz denemelerde L4B2 bitkisinde herhangi bir PMMoV enfeksiyonuna rastlamadığı ve AP-7/AP-8, 0602I2END, P118/P119 primerleri ile L4 geninin varlığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar birleştirildiğinde 087H3T7 primerinin başarı oranını düşüren bir parametre olduğu kanısına varılmaktadır. Daha geniş populasyon aralığında bu primerlerin başarı oranlarının irdelenmesi araştırmacıların doğru sonuçlara ulaşması için atılacak önemli bir adımdır. Ayrıca [Yang ve ark. \(2009\)](#) L3 ve L4 markırları arasındaki genetik uzaklığın *C. annuum*/*C. chinense* veya *C. annuum*/*C. chacoense* arasında meydana gelen melezler arasında farklılıklar gösterebileceğini belirtmişlerdir. Melezler arasındaki farklılıkların bu genlerin çalışma aktivitelerinde herhangi bir farklılık meydana getirip getirmediğinin belirlenmesi gerekmektedir.

L genleri için farklı sıcaklıklara bağlı aleller L1a, L1c ve L2b, *C. annuum* cv. KC780, *C. chinense* KC667 ve *C. baccatum* PI 439381-1-3 üzerinde tanımlanmıştır ([Tomita ve](#)

[ark. 2011](#)). L4 gen aktivitesinin farklı sıcaklıklar gibi değişik çevre etmenleri tarafından etkilenip etkilenmediğinin belirlenmesi amacıyla çalışmamızın, biyolojik test kısmı bir yılın tüm zaman dilimine dağıtılarak ve farklı ortamlar (sera ve iklimlendirme) temel alınarak planlanmıştır. Bu planlamanın amacı sıcaklık etkilerinin monogenik dominant gen olarak belirtilen ([Boukema 1983](#); [Van Duin 1998](#)) L4 geninin sıcaklığa bağlı olarak gösterdiği davranışların belirlenmesi ve son yıllarda Antalya'daki biber üretim alanlarında neden olan PMMoV enfeksiyonlarında sıcaklık faktörünün L4 genine bağlı olarak davranışındaki etkilerindeki payının belirlenmesidir. Bir yıl boyunca farklı mevsimlerde planlamış olduğumuz biyolojik test sonuçlarında L4B2, L4B3, L4B4, L4B5, L4B6 bitkilerinde herhangi bir symptomun oluşmaması hem makroskobik gözlemlerle hem de moleküler yöntemler ile belirlenmiştir. Bu veriler birleştirildiğinde PMMoV-Kum izolatının epidemilerinde sıcaklık etmeninin önemi olmadığı belirlenmiştir.

PMMoV-Kum izolatının bitkiler üzerindeki gözlemleri ve moleküler çalışmaları birleştirildiğinde geriye tartışılması

gereken diğer konu bu izolatın dünya izolatları ile arasındaki filogenetik ilişkinin belirlenmesidir. Bu izolatın Velasco ve ark. (2002)'nin geliştirdiği primerler kullanılarak RT-PCR çalışmaları ile PMMoV'ye ait olduğu doğrulanmıştır. Bu izolatın evrimsel ilişkileri hakkında yorumlarda bulunmak ve göç haritası hakkında ipuçları alabilmek için sekans hizmetleri alınmış ve filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir. Sekans hizmetleri sonucunda 793 bp uzunluğunda PMMoV'ye ait genom parçası elde edilmiştir. Elde edilen PMMoV-Kum izolatına ait sekans bilgileri NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanı üzerinde MK806437 aksesyon numarası ile kayıt edilerek araştırmacıların kullanımına sunulmuştur. Bu kısa sekans parçası PMMoV-Kum izolatının BLAST Analizlerinde (NCBI veri tabanında nükleotid bazında yapılan kıyaslama) en yakın ilişkiyi %100 oranında KC288153 izolatı ile kurduğu görülmüştür. KC288153 izolatı 2009 yılında Sırbistandan elde edilen PMMoV'ye ait bir sekanstır (Milosevic ve ark. 2012). Bu araştırma grubu rapor ettikleri PMMoV sekansının kılıf proteinine özgü bölgeyi amplifiye ederek yaptıkları kıyas analizlerinde bu izolatın L3 geninin sağladığı dayanımı kıramayan P1.2 patotipine ait olduğunu belirtmişlerdir.

PMMoV-Kum izolatının filogenetik analizi için Türkiye, Sırbistan, Japonya, Çin, Kanada, Güney Kore, Brezilya, Tunus, Amerika Birleşik Devletleri, Hindistan, İspanya, Venezuela, Avustralya'nın dahil olduğu 13 ülke filogenetik analize dahil edilmiştir. Çizelge 4'de filogenetik analize tabi tutulan izolatlara ait bilgiler paylaşılmıştır. Filogenetik ağaç oluşturulurken dikkat edilen önemli bir unsur ise konukçu aralığı olmuştur. Filogenetik analize dâhil edilen 16 izolatın konukçuları incelendiğinde 9 tanesi biber, 3 tanesi ise yabancı otlardan oluşmaktadır. Oluşturulan Filogenetik ağaç Şekil 4'de paylaşılmıştır.

Filogenetik ağaca ait veriler incelendiğinde PMMoV'e ait izolatların iki ana gruba bağlı olarak dallandığı görülmektedir. I.

grup olarak nitelendirilen kümede genel olarak L4 ve L3 dayanımını kıran P1.2.3. ve P1.2.3.4 izolatların var olduğu görülmekte iken ülkemizin Antalya-Kumluca bölgesinden elde edilen PMMoV-Kum izolatında dâhil olduğu II. gruba ait olduğu belirlenmiştir. 2016-2017 yılında Antalya-Kumluca bölgesinden elde edilen izolatların Grup II'de yer alması bu izolatın L4 dayanımını kıran bir patotipe ait olmadığını sonucunu moleküler ve klasik testlemelerden sonra filogenetik analizi ile de doğrulanmasına imkân sağlamıştır.

Ülkemizde son yıllarda biber üretim alanlarında problem olan PMMoV patotipinin L3 genini kıran P1.2.3 patotipi olduğu düşünülmektedir. Çağlar ve ark. (2012)'nin yılında yaptıkları çalışmalarında L3 dayanımını kıran izolatın ülkemizde varlığından söz etmişlerdir. Şuan ki biber üretim alanlarında L4 dayanımını kıran izolata rastlanmamıştır. Ama ülkemizde P1, P1.2 patotiplerinin varlığı veya yokluğuna dair bir çalışma da mevcut değildir. Choi ve ark. (2013, 2014) Kore'de gerçekleştirdikleri çalışmalarında P1.2 ve P1.2.3 patotiplerinin bulunabildiğini belirtmişlerdir. Antignus ve ark. (2008) ise İsrail'de benzer bir çalışma yürüterek P1.2 ve P1.2.3 patotiplerinin varlığını önceden belirlemişlerdir. Arazi surveylerinde PMMoV ile benzer özellikler sergileyen örnekleri toplayıp RT-PCR yöntemi kullanılarak PMMoV ile enfekteli olduğunu doğrulamışlardır. Elde edilen kılıf proteininin tüm nükleotid dizilimlerini kullanarak bu protein alanı içerisinde meydana gelen bir mutasyonun P1.2.3.4 patotipini meydana getirdiği sonucuna varmışlardır. Genda ve ark. (2007) Japonya'da gerçekleştirdikleri çalışmalarında benzer yöntemleri kullanarak PMMoV'in agresiflik derecesi en yüksek patotipi olarak P1.2.3.4 patotipinin varlığını rapor etmişlerdir. Ülkemizde 2017-2018 üretim dönemi içerisinde sıklıkla karşılaşılan PMMoV izolatının klasik testlemeler ve moleküler yöntemler ile L4 dayanımını kıran bir patotip olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4. Filogenetik analizler için kullanılan izolatlara ait bilgiler.

Table 4. Information on isolates used for phylogenetic analysis.

Sıra	NCBI numarası	Patotip	Ülke	Konukçu	Benzerlik oranları (%)
1	MK806437		Türkiye	<i>Capsicum annuum</i>	
2	PMMoV-Kum				
3	KC288153	L4BV	Sırbistan	<i>Capsicum annuum</i>	100.00
4	AB276030		Japonya	Yeşil biber	99.75
5	AB254821	Patotip P1.2	Japonya		99.75
6	KP345899		Çin	<i>Capsicum annuum</i>	97.60
7	KU311159		Kanada		99.12
8	KR108206		Güney Kore	<i>Rorippa palustris</i>	97.73
9	AB550911	BR-DF01	Brezilya		97.73
10	KR108207		Güney Kore	<i>Leonurus sibiricus</i>	97.60
11	EF061142		Tunus	Biber	97.60
12	MH063882		ABD	Şili biber	97.23
13	KJ631123		Hindistan	<i>Capsicum annuum</i>	97.23
14	LC082100	P3	Güney Kore	Acı biber	94.18
15	KX063611	P1.2	İspanya	Biber	97.73
16	KU312319		Venezuela		97.35
17	MH427282		Avustralya	<i>Apis mellifera</i>	97.35



Şekil 4. PMMoV-Kumluca izolatına ait filogenetik analizler.

Figure 4. Phylogenetic analysis of PMMoV-Kum isolate.

PMMoV'nin 2019 yılında ülkemizde *L4* dayanıklılık genini kıran izolatın bulunmaması ilerleyen dönemlerde karşımıza çıkmayacağı anlamına gelmemektedir. Dünyanın farklı bölgelerinde *L4* genini kıran bu izolatın varlığına dair raporlar mevcuttur. Bu raporların genel özellikleri dünyanın farklı bölgelerinde PMMoV'nin farklı patotiplerinin karşımıza çıkabileceğidir. Bu araştırmalardan elde ettiğimiz sonuç ise okları karantina uygulamalarına çevirmektedir. Biber üretim alanlarının yetiştirilme periyodu boyunca başta TSWV, PVY, CMV, TMV, PMMoV gibi birçok virüs tarafından tehdit altındadır. Özellikle TSWV'nin dayanıklılığı kıran ırkının varlığı yetiştirilme alanlarının büyük bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu hastalık ile mücadelede henüz dünyada bir çalışmanın varlığının söz konusu olmamasından dolayı, yakın gelecekte çözümü olmayan PMMoV'in *L4* genini kıran ırkının ülkemize girmemesi için dikkat edilmesi gereken bir konudur. Bu amaç için karantina uygulamalarına ağırlık verilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Ayrıca *Tobamovirüs*ler toprakta uzun süre kalıcılığını sürdürebilmekte ve kökler geliştikçe açılan küçük yaralardan giriş yaparak enfeksiyonlarını meydana getirebilmektedir. Bu konu göz önünde tutulduğunda toprak dezenfeksiyonun önemini artırmaktadır. Özellikle 2009 yılından bu yana toprak dezenfeksiyonlarında tercih edilen metil bromid'in yasaklanması ile toprak kökenli patojenlerin oranında artışlar görülmüştür. Alternatif çevre dostu kimyasal uygulamaları belirlense de üreticilerin bu konu hakkında bilinçlendirilmeleri ve bu uygulamaların geliştirilmesi gerekmektedir.

4. Sonuç

Son yıllarda biber üretim alanlarında virüs hastalıklarının görülme insidansında artışlar meydana gelmiştir. Üretim alanlarında kültürel-fiziksel ve kimyasal kontrol yöntemlerinin

bilinçsiz yapılması virüslerin ve onlara vektörlük yapan etmenlerin bu alanlara erişimini kolaylaştırmıştır. Son yıllarda Antalya'da özellikle Kumluca ilçesinde biber üretim alanlarında sık rastlanan virüslerden biri olarak karşımıza PMMoV'nin çıkması ve virüsün diğer *Tobamovirüs*ler gibi tohumla taşınması nedeniyle ciddiye alınması gereken bir problem olduğunu bizlere göstermektedir. Bu bağlamda incelenmesi gereken bir diğer konunun PMMoV ile mücadelede *L4* gen aktivitesinin enfeksiyonlara verdiği cevapların nitelendirilmesi gerekliliğidir. Yapılan biyolojik testlemeler ve moleküler analizler neticesinde *L4* geni tarafından sağlanan dayanıklılığın hala etkin olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca *L4* tanılamaya yönelik en etkili markırlar AP-7/AP-8 ve P118-P119 markırları olarak belirlenmiştir. Doğru markır seçiminin doğru tanılamayı sağlayacağından *L4* genine yönelik çalışmalarda bu verilerin önemi oldukça büyüktür. Ayrıca PMMoV-Kum izolatının nükleotid bilgileri elde edilerek NCBI (Uluslar Arası Gen bankası-MK806437) kayıt edilmiş ve filogenetik analizleri gerçekleştirilmiş ve dünya izolatları arasında konumu belirlenmiştir.

Kaynaklar

- Antignus Y, Lachman O, Pearlsman M, Maslenin L, Rosner A (2008) A New Pathotype of Pepper mild mottle virus (PMMoV) Overcomes the *L4* Resistance Genotype of Pepper Cultivars. *Plant Disease* 92(7): 1033–1037.
- Berzal-Herranz A, de la Cruz A, Tenllado F, Díaz-Ruiz JR, López L, Sanz AI, Vaquero C, Serra MT, García-Luque I (1995) The Capsicum *L3* gene-mediated resistance against the Tobamoviruses is elicited by the coat protein. *Virology* 209: 498-505.
- Boukema IW (1980) Allelism of genes controlling resistance to TMV in Capsicum L. *Euphytica* 29: 433–439.

- Boukema IW (1983) Research on the location of the gene for resistance to TMV in *Capsicum chacoense* Hunz. and male sterility in progenies from the cross *C. chacoense* × *C. annuum* L. Proceedings Vth Meeting Capsicum and Eggplant Working Group of Eucarpia, Bulgaria, p. 84-87.
- Boukema IW (1984) Resistance to TMV in *Capsicum chacoense* Hunz. is governed by an allele of the L-locus. *Capsicum Newsletter* 3: 47-48.
- Choi GS, Choi SK, Cho JD, Cho IS (2013) A pathotype of Pepper Mild Mottle Virus causing necrotic spot symptoms in paprika fruit. *Research in Plant Disease* 19: 124-127.
- Choi GS, Choi SK, Cho IS, Kwon SJ (2014) Resistance screening to Pepper Mild Mottle iVrus pathotypes in paprika cultivars. *Research in Plant Disease* 20: 299-302.
- Csillery G, Tobias I, Rusko J (1983) A New Pepper Strain of Tomato Mosaic Virus. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 18: 195-200.
- Çağlar BK, Fidan H, Elbeaino T (2012) Detection and Molecular Characterization of Pepper Mild Mottle Virus from Turkey. *Journal of Phytopathology* 161(6): 434-438.
- FAOSTAT (2018) Statistical database. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Accessed 11 May 2018.
- Fidan H, Sarı N (2019) Molecular Characterization of Resistance-Breaking Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) Isolate Medium Segment in Tomato. *Applied Ecology and Environmental Research* 17(2): 5321-5339.
- Genda Y, Kanda A, Hamada H, Sato K, Ohnishi J, Tsuda S (2007) Two amino acid substitutions in the coat protein of Pepper mild mottle virus are responsible for overcoming the L4 gene-mediated resistance in *Capsicum* spp. *Phytopathology* 97: 787-793.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Oxford University Press, Nucleic Acids Symposium Series No.41*: 95-98.
- Janzac B, Fabre MF, Palloix A, Moury B (2009) Phenotype and spectrum of action of the Pvr4 resistance in pepper against potyviruses, and selection of virulent variants. *Plant Pathology* 58: 443-449.
- Kim HJ, Han JH, Yoo JH, Cho HJ, Kim BD (2008) Development of a sequence characteristic amplified region marker linked to the L4 locus conferring broad spectrum resistance to tobamoviruses in pepper plants. *Molecules and Cells* 25: 205-210.
- Kumar S, Udaya AC, Nayaka SC, Lund OS, Prakas HS (2011) Detection of *Tobacco mosaic virus* and *Tomato mosaic virus* in pepper and tomato by multiplex RT-PCR. *Letter in applied Microbiology* 359-363.
- Lefebvre V, Pflieger S, Thabuis A, Caranta C, Blattes A, Chauvet JC, Daubeze AM, Palloix A (2002) Towards the saturation of the pepper linkage map by alignment of three intraspecific maps including known-function genes. *Genome* 45(5): 839-854.
- Matsunaga HT, Saito M, Hirai T, Yoshida T (2003) DNA markers linked to pepper mild mottle virus (PMMoV) resistant locus (L4) in *Capsicum*. *Japanese Society for Horticultural Science* 72: 218-220.
- Milosevic D, Stankovic I, Bulajic A, Nikolic Z, Ignjatov M, Krstic B (2012) Molecular characterization of Pepper mild mottle virus in Serbia. *Genetika* 47(2): 651-663.
- Pernezny K, Roberts PD, Murphy JF, Goldberg NP (2003) *Compendium of Pepper Diseases*. St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society, p. 73.
- Rast ATB (1988) Pepper tobamoviruses and pathotypes used in resistance breeding. *Capsicum Newsletter* 7: 20-23.
- Sawada H, Takeuchi S, Matsumoto K, Hamada H, Kiba A, Matsumoto M, Watanabe Y, Suzuki K, Hikichi Y (2005) A new Tobamovirus-resistance gene, Hk, in *Capsicum annuum*. *Japanese Society for Horticultural Science* 74: 289-294.
- Scholthof KBGS, Adkins H, Czosnek P, Palukaitis E, Jacquot T, Hohn B, Hoh K, Saunders T, Candresse P, Ahlquist C, Foster GD (2011) Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 12: 938-954.
- Tomita R, Ken-Taro S, Hiroyuki M, Sakamoto M, Murai J, Kiba A, Hikichi Y, Suzuki K, Kobayashi K (2011) Genetic basis for the hierarchical interaction between Tobamovirus spp. and L resistance gene alleles from different pepper species. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24: 108-117.
- TUİK (2018) Statistical database. http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001. Accessed 01 May 2018.
- Van Duin PJW (1998) Xth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum & Eggplant, Avignon, France.
- Velasco L, Janssen D, Ruiz-Garcia L, Segundo E, Cuadrado IM (2002) The complete nucleotide sequence and development of a differential detection assay for a pepper mild mottle virus (PMMoV) isolate that overcomes L3 resistance in pepper. *Journal of Virological Methods* 106(1): 135-140.
- Wetter C, Conti M, Altschuh D, Tabillion R, Van Regenmortel MHV (1984) Pepper Mild Mottle Virus, a Tobamovirus infecting pepper cultivars in Sicily. *Phytopathology* 74(4): 405-410.
- Yang HB, Liu WY, Kang WH, Jahn M, Kang BC (2009) Development of SNP markers linked to the L locus in *Capsicum* spp. by a comparative genetic analysis. *In Molecular Breeding* 24(4): 433-446.