

TÜBİTAK

2008-90



TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU
THE SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

Temel Bilimler Araştırma Grubu
Basic Sciences Research Grant Group

Q/ 92906

Solanum tuberosum Populasyonunda Patates X Virüsüne (PVX)
Karşı Dayanıklılığı Kontrol Eden Genlerin Belirlenmesi ve
Moleküler Haritalanması

Proje No: 104T284

Yrd. Doç. Dr. Fevziye ÇELEBİ-TOPRAK
Doç.Dr. Anne FRARY
Doç. Dr. Sami DOĞANLAR
Eminur BARUTÇU

MAYIS 2008
DENİZLİ

ÖNSÖZ

Bu proje kapsamında, *Solanum tuberosum* populasyonunda patates X virüsüne (PVX) karşı dayanıklılığı kontrol eden gen belirlenmiş ve moleküler haritalanması gerçekleştirilmiştir. Bu proje TÜBİTAK tarafından Yrd. Doç. Dr. Fevziye Çelebi Toprak'a sağlanan destekle tamamlanmıştır (TÜBİTAK 104T284).

Yazarlar

Yazarlar

Yazarlar

Yazarlar

Yazarlar

Yazarlar

Yazarlar

Yazarlar

Yazarlar

Yazarlar

Yazarlar

Yazarlar

Yazarlar

Yazarlar

Yazarlar

Yazarlar

Yazarlar

Yazarlar

Yazarlar

Yazarlar

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTESİ.....	3
TABLO LİSTESİ.....	4
ÖZET.....	5
ABSTRACT.....	6
1.GİRİŞ.....	7
2.GENEL BİLGİLER.....	8
2.1. Patates.....	8
2.2. Patates X Potexvirüs.....	9
2.3. Patates X Potexvirüs Dayanıklılığı Haritalaması ile İlgili Önceki Çalışmalar.....	10
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	11
3.1.Bitkisel Materyal.....	11
3.2. <i>In vitro</i> Bitkilerin Çoğaltılması.....	12
3.3.PVX Testleri için Bitkiçiklerin Hazırlanması.....	13
3.4. Virüs Kaynağı.....	16
3.5.Mekanik İnokulasyon.....	16
3.6.Fenotipik Karakterizasyon.....	18
3.7.Genotipik Karakterizasyon.....	20
4.BULGULAR.....	22
4.1.PVX İnokulasyonundan Elde Edilen Sonuçlar.....	22
4.2. Moleküler Analizler.....	25
4.2.1.AFLP.....	25
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	29
6.YARARLANILAN KAYNAKLAR.....	31
EKLER: YAYINLARDAN ÖRNEK	

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. In vitro bitkiçikler cam tüpler içerisinde.....	12
Şekil 2. Cam test tüp içerisinde yeterli büyüklüğe ulaşmış bitki.....	13
Şekil 3a. Bitkiçikler plastik kaplara aktarılmış ve naylon poşet ile sarılmış.....	13
Şekil 3b. Plastik poşet kaldırılmış bitkiler uzaktan ve yakından görüntüsü.....	14
Şekil 4a. Bitki plastik kaptan çıkartılmış ve saksıya aktarılmak üzere hazırlanıyor.....	14
Şekil 4b. Bitkiçik saksıya ekiliyor.....	14
Şekil 4c. Ekilmiş bitkiçik sulanıyor.....	15
Şekil 5a. Tam teşekküllü büyütme odasının dıştan görünüşü.....	15
Şekil 5b. Büyütme odasında PVX testlemesi için hazır bitkiler.....	15
Şekil 6. Seyreltilmiş inokulum kaynağı buz üzerinde.....	15
Şekil 7. Bitkilere karborandum serpilirken.....	17
Şekil 8a. İnokule edilen yapraklar işaretlenirken.....	17
Şekil 8b. İnokule edilmiş yaprak işaretlenmiş.....	17
Şekil 9. Bitki yaprakları eziliyor ve ekstraksiyon tamponu içerisine alınıyor.....	18
Şekil 10. Bitki öz sularının her bir kuyucuğa yüklenmesi.....	19
Şekil 11. ELISA tabak mikropilaka yıkayıcısında yıkılıyor.....	19
Şekil 12. ELISA tabaklarında renk değişikliği.....	20
Şekil 13. BCT popülasyonu ve anaç bitkilerinin PVX ile mekanik inokülasyonu sonucu elde edilen ELISA sonuçları.....	23
Şekil 14. Ebeveynlerin ve projenin olası genotipi.....	24
Şekil 15. Overlay grafiği bir primer kombinasyonunda kullanılan 94 örnek için standart büyüklüklerinin üst üste gelmesini göstermektedir.....	26
Şekil 16. E-ACT/M-CAG primer kombinasyonu için elde edilen bir AFLP grafiği örneği.....	27
Şekil 17. Bir AFLP primer kombinasyonu için dört örneğin AFLP sonuçlarının gösterildiği stacked grafiği.....	28

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Türkiye’de yıllara göre patates üretimi ve verimi(ha).....	9
Tablo 2 AFLP’de uygulanan primer kombinasyonları.....	22
Tablo 3. AFLPanalizleri için filterleme parametreleri.....	22
Tablo 4. Diploit patates popülasyonundan (<i>S. tuberosum</i> and <i>S. berthaultii</i>) oluşturulan BCT popülasyonunda PVX’e karşı dayanıklılık sonuçları.....	24
Tablo 4. PVX dayanıklılığı ile bağlantı halinde olan moleküler işaretleyiciler.....	30

ÖZET

Patates üretimini bütün dünya'da olduğu gibi kısıtlayan en önemli faktörlerden biri değişik virüslerin sebep olduğu viral hastalıklardır. Potato X potexvirus (PVX) patates bitkisini infekte eden virüsler arasında en yaygın ve zararlı olanıdır. PVX virüsü bitkilere mekanik olarak taşındığı gibi tohumluk olarak kullanılacak yumrulardan da geçebilmektedir. Bu yüzden dayanıklı çeşit kullanmak belki de bu virüse karşı en etkili kontrol metodudur. Günümüzde bu virüse karşı bir çok dayanıklı çeşit geliştirilmiş ve çiftçiler tarafından kullanılmaktadır. Fakat, ülkemizde yetiştirilen patates çeşitlerinin hiç birinde bu virüse karşı dayanıklılık mevcut değildir.

Bu çalışmada Patates X virüsüne karşı dayanıklılık diploit bir patates genotipinden (*Solanum tuberosum*dan var. HH1-9) belirlenmiştir. Populasyonun geliştirilmesinde kullanılan ebeveynler arasında HH1-9, USW2230, M200-30, BIIA, ve BIIB hatları yer almaktadır. BIIA ve HH1-9 hatlarının melezlenmesinden oluşturulan 123 adet BCT populasyonu PVX ile mekanik olarak inokule edilmiştir. İnokule edilen bitkiler, iki haftalık (inokule edilen yapraklar) ve dört haftalık (sistemik yapraklar) dönemlerde olmak üzere virüs varlığının saptanması için DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ile analiz edilmiştir. Dayanıklı anaç HH1-9 ve 68 adet BCT bitkisi PVX'e karşı bağışık (immünite) oldukları gözlenmiştir. Bu bitkilerin ne inokule edilen yapraklarında ne de üst (sistemik) yapraklarında virüsün varlığı ELISA ile tespit edilmemiştir ve bitkilerde herhangi bir semptom gözlenmemiştir. Fakat, duyarlı anaçlarda (USW2230, M200-30, BIIA ve BIIB) ve 55 BCT bitkisinde hem inokule edilen yapraklarında ve hemde sistemik yapraklarında virüs varlığı yoğun bir şekilde ELISA ile tespit edilmiştir. Fenotipik açılıma göre yapılan genetik analizler sonucunda dayanıklılığın tek genle kontrol edildiği belirlenmiştir. Elde edilen veriler χ^2 ile test edildiğinde 68 dayanıklı : 55 duyarlı (1:1) ($p = 0,24$) şeklinde BC1 populasyonundan beklenen açılım gözlenmiştir.

Moleküler işaretleyicilerle (RFLP ve AFLP) yapılan haritalama çalışmaları sonucunda PVX dayanıklılığı ile bağlantılı olan AFLP ve RFLP işaretleyicileri ikinci kromozom üzerinde belirlenmiştir.

Anahtar Kelime: Dayanıklılık, immün, PVX, patates, Moleküler Haritalama

ABSTRACT

Viral diseases are a serious limitation to potato production in all areas where the crop is grown. Potato X potexvirus (PVX) is one of the most harmful and widespread of these diseases. PVX is mechanically transmitted and can also be transmitted to the next generation via tubers. Therefore, extreme care must be taken to plant only virus-free material and to prevent contamination from infected plants and farm machinery and tools. An alternative is the use of virus resistant cultivars. Although several PVX resistant cultivars have been developed, none of the cultivars grown in Turkey carry such resistance.

In this study, resistance to the Potato X potexvirus (PVX) was identified in diploid potato progeny from a population derived from *Solanum tuberosum* (HH1-9). Parents (HH1-9, USW2230, M200-30, BIIA, ve BIIB) and 123 backcross population (BCT) were mechanically inoculated with PVX. In order to detect the virus replication in inoculated (2 weeks) and systemic leaves (4 weeks) DAS-ELISA test was done. The parent (HH1-9) and 68 backcross progeny population showed immune respond to PVX because no virus could be detected by ELISA. In contrast, parents (USW2230, M200-30, BIIA, BIIB), and 55 BCT progeny were infected according to ELISA, although plants remained symptomless. According to phenotypic analysis, resistance is controlled a single dominant gene. A chi-square goodness of fit test indicated segregation in the BCT population fit a ratio of 1:1 at $p = 0,24$, the expected ratio for this population assuming the resistance parent was heterozygous.

Resistance to PVX linked markers were identified by using RFLP and AFLP molecular markers. These markers are located on chromosome II.

Key Words: Resistance, immune, PVX, potato, Molecular Mapping

GİRİŞ

Patates dünyada buğday, pirinç ve mısırdan sonra gelen en önemli temel besin kaynakları arasında dördüncü sırada; ülkemizde ise karbonhidrat kaynağı olarak buğday'dan sonra ikinci sırada yer almaktadır. Yumrularının %20-30 nişasta içermesi, %2 civarında proteine sahip olması, B1, B2, B6 ve C vitaminleri ile bazı elementleri ihtiva etmesi nedeniyle; insanlar için önemli bir gıda kaynağı olup, aynı zamanda nişasta, alkol ve ispirito endüstrilerinin de hammaddelerini oluşturmaktadır. Patates ülkemizde kızartma, haşlama, fırında pişirme, yemeklik olmak üzere pek çok değişik şekilde genel tüketim ve sanayi kullanımına yönelik olmak üzere tüketilmektedir. Ülkemizde patates toplam 200.000 ha. alanda ekilmekte ve yılda 5.300.000 ton üretilmektedir. Dünya'da patates verimi yaklaşık 1518 kg/da iken Türkiye'de patates verim ortalaması 2400 kg/da civarındadır. Dünya'da ve ülkemizdeki nüfus artışı ve aynı zamanda ülkemizin iklim ve ekolojik durumları dikkate alındığında, patates Türkiye'de en fazla gelecek vaad eden ve dünyada giderek artan açlık sorununa cevap verebilecek önemli bitkilerin başında yer almaktadır. Dolayısıyla, temel gıdalar arasında yer alması, sanayide kullanımı ve ürünlerinin yüksek ihracat potansiyeli gibi nedenlerle patates Türkiye için stratejik öneme sahip olan bir üründür.

Tüketimde buğdaydan sonra ikinci sırada yer almasına rağmen Türkiye'nin patates tohumluk ihtiyacı yerli ve yabancı tohum firmaları tarafından Avrupa'dan ithal edilmektedir. Ülkemizde sadece bir kaç patates çeşiti yetiştirilmektedir. Ancak bu çeşitlerin hiç birisi hastalıklara karşı dayanıklı değildir (HAVERKORT, 1981 ve BOLAT, 1979). Bu nedenle yetiştiriciliğinin yapıldığı her yöremizde patates üretiminde ciddi maddi kayıplar meydana gelmektedir. Patates üretiminde, hastalıklardan dolayı meydana gelen ürün kayıplarının bir kısmı tarlada, bir kısmı pazarlama ve saklamada, önemli bir kısmı da ürünün bir sonraki yıl tohum olarak depolanması sırasında gerçekleşmektedir (HAVERKORT, 1981). Zarar yapan hastalıklar arasında virüsler ürün kayıplarının önemli bir kısmına sebep olmaktadır (HAVERKORT, 1981; HOOKER 1977; BEEMSTER ve DE BOKX, 1987).

Viral etmenler arasında patates Y potyvürsü (PVY), patates yaprak kıvrılma virüsü (PLRV), hıyar mozaik virüsü (CMV), patates A virüsü (PVA) ve patates X potex virüsü (PVX) gibi virüslerin sebep olduğu viral hastalıklar ülkemizde patates üretimini (verim ve kalite bakımından) kısıtlayan en önemli hastalıklardır. Viral hastalıklar içerisinde ise PVX patatesi infekte eden en yaygın ve zararlı virüslerin başında gelmektedir.

Virüs dayanıklılığı çalışmaları verim ve ürün kalitesini arttırması ve virüs vektörlerini kontrol etmek için daha az pestisit kullanımı gibi olumlu sonuçlarından dolayı önemli bir ıslah çalışma konusudur. Son zamanlara kadar çok büyük yatırımlar yapılmasına rağmen ıslah yöntemleri ile virüslere dayanıklılığı sağlayan bir ıslah hattı henüz geliştirilememiştir. Bu durumun bir çok sebebi arasında en önemlisi fenotipe dayalı seleksiyonlar da istenilen düzeyde başarılı sonuçların alınmamasıdır. Dolayısıyla, en önemli patates virüs hastalık etmenlerine karşı dayanıklılığı sağlayan genlerin patates genomunda haritalanması ve bu genlerle bağlantılı olan moleküler işaretleyicilerin belirlenmesi ile birlikte bu genlerin moleküler ıslahı imkan dahilinde olmuştur. PVY ve PVX virüs hastalık etmenlerine yönelik patates'te son zamanlarda çok sayıda haritalama çalışmaları yapılmış ve dayanıklılıkta rol oynayan genetik faktörler belirlenmiştir ve bu genlerle bağlantı gösteren moleküler işaretleyiciler ortaya konmuş ve artık dünyada (kısmende ülkemizde) rutin olarak kamu ve özel sektör patates ıslah programlarında kullanılmaya başlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Patates

Patates Solanaceae familyasına ait tek yıllık bir bitkidir. Anavatanı Güney Amerika'nın Andes Dağları olarak kabul edilmektedir. İlk defa Güney Peru ve Bolivya da kültür olarak ekilmiş. Kültüre edilmiş bütün türleri tetraploidir (BAMBERG ve DEL RIO, 2005).

Bitkinin toprak altında kalan yumruları "patates" olarak bilinir. Bu yumrular nişasta bakımından zengin olduğundan önemli bir besin maddesidir (<http://www.uga.edu/vegetable/potato.html>). Patatesten nişastadan başka belirli oranlarda protein, bazı vitaminler ve elementleri ihtiva etmesi nedeniyle besin değeri yüksek bir gıda kaynağıdır. Bitkinin toprak üstü kısımlarında zehirli alkoloitler bulunmasına karşılık yumruları zehirli değildir. Ancak çimlenmiş patateslerde de bu alkoloitler teşekkül ettiğinden zehirlenmelere sebebiyet vermektedir. Patates kızartma, haşlama,

fırında pişirme, yemeklik olmak üzere pek çok değişik şekilde genel tüketim ve sanayi kullanımına yönelik olmak üzere tüketilmektedir.

Ülkemizde hemen her yörede olmak üzere toplam 200.000 hektar alanda yetiştirilen patates, daha çok Nevşehir, Niğde, Adapazarı, Afyon, Ödemiş / İzmir yörelerinde üretilmektedir. Toplam üretim 4.8 milyon ton civarındadır (<http://www.toros.com.tr>). Tablo 1 de yıllara göre patates üretimi ve verimi gösterilmektedir.

Tablo 1. Türkiye’de yıllara göre patates üretimi ve verimi(ha)
(<http://www.afyontarim.gov.tr>)

Yıllar	Ekilen alan (ha)	Üretim (ton)	Verim (Kg/ha)
1991	200.400	4.600.000	22.954
1992	195.000	4.600.000	23.589
1993	192.000	4.650.000	24.218
1994	190.000	4.350.000	22.894
1995	200.000	4.750.000	23.750
1996	210.000	4.950.000	23.571
1997	211.000	5.100.000	24.170
1998	203.000	5.250.000	25.862
1999	220.000	6.000.000	27.272
2000	205.000	5.370.000	26.195
2001	200.000	5.000.000	25.041
2002	198.000	5.200.000	26.297
2003	-	-	-

2.2. Patates X Potexvirüs

Patates X potexvirüs (PVX) potexvirüs grubuna aittir (AGRIOS, 1997). Patates X virüsü, bükülebilir çubuk yapıda, tek sarmallı RNA (2100 kDa) içeren, 515x13nm boyutlarındadır. Virüs partikülleri %6 nükleik asit, %94 protein içerir (<http://www.kkgm.gov.tr>). PVX kolaylıkla mekanik olarak ya da infekte olmuş patates yumruları yolu ile taşınır ve patates veriminde büyük kayıplara neden olmaktadır (HOOKER, 1977; ROSS, 1986).

PVX mekanik olarak kolaylıkla taşındığından dolayı, yaprakların birbirleri ile teması alet ve ekipman, dikim makinaları, Patates böceği ve çekirgeler gibi ısırıcı çiğneyici ağız yapısına sahip böcekler ile rahatlıkla yayılır. İlk yıl meydana gelen enfeksiyonlarda virüs genellikle birçok çeşitte simptom oluşturmaz, ancak yumrulardaki bulaşıklık oranı artar. Yumrularda virüsün olduğuna dair herhangi bir belirti görülmez. Buna rağmen bu enfeksiyonlardan dolayı verimde %10-30 azalma meydana gelir.

PVX, PVY ya da PVA ile birlikte enfeksiyon yaparsa şiddetli "Rugoz mozaik" hastalığına yol açar. Verim kaybı da bir o kadar artar. Virüsün bazı strainleri şiddetli yaprak ve yumru nekrozuna yol açarak bitkiyi öldürebilir. Yıl içinde meydana gelen enfeksiyonların oluşturduğu belirtiler, sıcaklığın 38° C'nin üzerinde olduğu zaman genellikle maskelenir (<http://www.tagem.gov.tr>).

Virüsün diğer konukçuları domates ve tütündür. Ancak enfekteli tohumlar virüsün esas bulaşma kaynağıdır. Virüs demir, odun ve toprak gibi yüzeylerde 3 saatten 24 saate kadar canlılığını sürdürebilir. Bu süre içerisinde virüs bulaşık yumrulara sağlam yumrulara kolayca bulaşabilir (<http://www.tagem.gov.tr>).

Bir kere eldeki ürün virüs ile enfekte olduğunda bu bir sonraki generasyon için hastalık kaynağını teşkil etmektedir. Bu koşullar altında, PVX'e dayanıklı çeşit geliştirilmesi patates ürününü korumak için potansiyel olarak en etkili ve ekonomik stratejidir.

2.3. Patates X Potexvirüs Dayanıklılığı Haritalaması ile İlgili Önceki Çalışmalar

Daha önce yapılan çalışmalarda, PVX'e karşı aşırı dirençlilik (extreme resistance) (*Rx*) bazı yumru yapan *Solanum* spp.'de belirlenmiştir. Bu fenotipin (aşırı dirençlilik) bazılarının tek bir dominant gen tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir (CADMAN, 1942, COCKERHAM, 1945, COCKERHAM 1958, COCKERHAM 1970, ROSS 1986, RITTER ve ark., 1991, VALKONEN ve ark., 1996, BENDAHMANE ve ark., 1997, ve BRIGNETI ve ark. 1997). Ayrıca, PVX'e dayanıklılık sağlayan bazı genlerin patates genomundaki kromozomal bölgeleri belirlenmiştir. Bu genlerden *Rx1* ve *Rx2* aşırı dirençlilik sağlamakta ve mevcut bütün PVX izolatlarına karşı dayanıklılık gösterebilmektedir (COCKERMAN, 1970) ve ayrıca bu genler patatesin 5. ve 12. kromozomlarında haritalanmıştır (RITTER ve ark., 1991). *Rx* geni ise yine patatesin 12. kromozomunda haritalanmıştır (BENDAHMANE ve ark., 1997). PVX'e hipersensitif (HR) dayanıklılık sağlayan diğer genler izolat spesifiktir. Bu genlerden *Nb* geni PVX'in 1. ve 2. grup izolatlarına karşı dayanıklılık sağlarken *Nx* geni ise PVX'in 1. ve 3. grup izolatlarına karşı dayanıklılık sağlamaktadır (COCKERHAM, 1955). Son zamanlarda, *Nb* geni 5. kromozomun *Rx2* genini içeren aynı bölgesinde haritalanmıştır (DE JONG ve ark., 1997).

Klasik yöntemleri kullanarak özellikle patates bitkisinde virüslere karşı dayanıklılık kaynaklarının kültür çeşitlerine aktarılmasında sınırlı başarılar elde edilmiştir. Halbuki moleküler markırların ve pek çok bitki türleri için moleküler

genetik haritaların geliştirilmesi, biyolojik ve ekonomik öneme sahip genlerin transferine büyük bir imkan tanımıştır. Özellikle domates, patates, patlıcan ve biber gibi Solanaceae ailesine ait bitki türleri için moleküler genetik haritalar hazırlanmıştır (TANKSLEY ve ark., 1992, LIVINGSTONE ve ark., 1999). Son yıllarda genetik haritalar kullanmak sureti ile bir çok virüslere karşı dayanıklılığı sağlayan genlerin patates genomundaki yerleri belirlenmiş ve link markırlar kullanmak suretiyle istenilen çeşitlere aktarılabilmişlerdir.

Patatesten doğal dayanıklılık sağlayan ilave PVX genleri belirlemek için yapılan bu projede, geri melezlemelerden oluşturulan bir diploid patates popülasyonu kullanılmıştır. PVX'e karşı bu popülasyonda aşırı dayanıklılık belirlenmiştir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

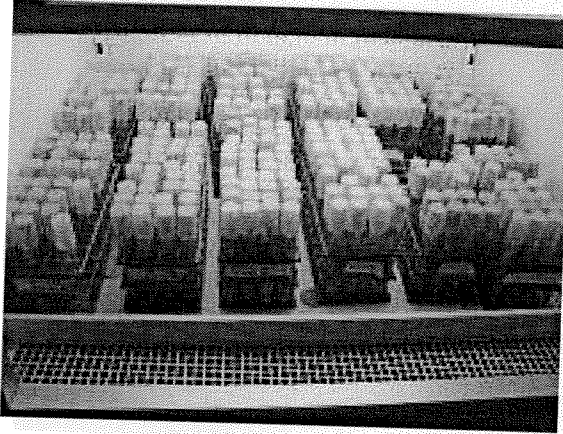
3.1.Bitkisel Materyal

Çalışmada kullanılan materyal geri melez popülasyonu olup diploid bir *Solanum berthaultii* ve diploid bir *Solanum tuberosum* melezlemesinden türetilmiştir. Elde edilen türler arası melez *Solanum tuberosum*'a (BC1 popülasyonu) geri mezlenerek geri melez (*backcross*) popülasyonu oluşturulmuştur (BONIERBALE ve ark., 1994). Buradaki ebeveynlerden USW2230 diploid bir *S. tuberosum* ($2x = 2n = 24$) olup tetraploid bir patates çeşiti olan *S. tuberosum* cv. Saco ($4x = 2n = 48$)'dan geliştirilmiştir. PI473331a ise *S. Berthaultii*'den geliştirilmiş bir USDA (accession) tohum örneğidir. HH1-9 *S. tuberosum* haploidlerinin birbiriyle mezlenmesinden (intermating) oluşturulan popülasyonundan dölleme yeteneğinde polen tozu üretme (male fertility) özelliği bakımından seçilmiş bir hattır (SANFORD VE HANNEMAN 1982). B11B ise yine dölleme yeteneğinde polen tozu üretme (male fertility) özelliği bakımından seçilmiş bir USDA accessioni PI473331b'dan türetilmiş bir klondur (BONIERBALE ve ark. 1994). Ebeveynler ve açılım gösteren BC popülasyonları diploid ($2n=2x=24$) yapıdadır ve bitkicikler (plantlets) *in vitro* olarak doku kültürü ortamlarında muhafaza edilmiş ve klonal olarak çoğaltılmıştır. Çalışma popülasyonu Dr. Sami Doğanlar ve Dr. Anne Frary tarafından sağlanmıştır. Popülasyonu oluşturan bitkiler original olarak US Potato Genebank, Sturgeon Bay, WI 54235, USA'den sağlanmıştır.

3.2. *In vitro* Bitkilerin oğaltılması

Patates X Virüsü (PVX) testlemelerinde kullanılmak üzere yeterli sayıda bitki üretmek için BCT popülasyonunun mikrooğaltılması yapılmıştır. Mikroođaltma için *in vitro* kültür řu şekilde oluşturulmuştur: Bitkicikler steril ortamdaki besi ortamından steril pens kullanılarak daha önceden otoklavda steril edilmiş kurutma kağıtlarının üzerine steril edilmiş makas ile kesilerek konulmuştur. Bu işlemler steril kabinde (laminar flow hood) gerçekleştirilmiştir. Steril bir makas yardımı ile yaklaşık olarak 1 cm uzunluğunda kesilen bitkiciklerin bir yada üç aksiller tomurcuk içermesine dikkat edilmiştir. 1 cm uzunluğunda kesilen bu bitkiciklerin kesilen kısımları steril bir pens yardımı ile daha önceden hazırlanmış steril besi ortamı içeren cam test tüpüne steril kabinde yerleştirilmiştir. Her bir tüp sadece bir kesilmiş bitkicik içermektedir. Bitkiciklerin oğaltılmasında standart Murashige ve Skoog (MS) besi ortamı kullanılmıştır. Besi ortamının hazırlanmasında pH 6.0'de, %3 şeker ve katılaştırılması içinde 2.5 g/l phytigel kullanılmıştır. Bitkicikler 22°C de ve 16 saat ışıklı 8 saat karanlıkta büyütme odasında tutulmuştur. *In vitro* bitkiciklerin kontrollü şartlarda muhafazası için her ay düzenli olarak yeni test tüplerine aktarılmıştır (Şekil 1). PVX inokulasyonu için her bir farklı bitkicikten en az 8 klon kullanılmıştır. Bunların altısı PVX inokulasyonu için ikisi negatif kontrol olarak kullanılmıştır. PVX testlemesi 2 seri halinde yapılmıştır.

Şekil 1. *In vitro* bitkicikler cam tüpler içerisinde.



3.3.PVX Testleri İçin Bitkiciklerin Hazırlanması:

Cam test tüpler içerisinde çoğaltılan bitkicikler yeterli büyüklüğe ulaştıktan sonra küçük plastik kapların içerisine toprağa aktarılmıştır ve nemi muhafaza etmek için plastik poşetler ile kaplanılmışlardır (Şekil 2). Bitkiler yeterli büyüklüğe ulaştınca plastik poşet çıkartılmıştır (Şekil 3a ve 3b). Yeterli büyüklüğe ulaşmış köklenmiş bitkiler daha iyi büyüme için 10 cm lik saksılara aktarılmışlardır (Şekil 4a, 4b, ve 4c). Saksılara aktarılan bitkiler PVX testlemesi için bitki büyüme kabinine aktarılmışlardır ve deneme boyunca 16 saat ışık ve 22 °C sıcaklık olacak şekilde tutulmuşlardır (Şekil 5a ve 5b). Bitkiler dört yapraklı devreye geldiklerinde PVX ile inoküle edilmişlerdir.

Şekil 2.Cam test tp içerisinde yeterli büyüklüğe ulaşmış bitkicik



Şekil 3a. Bitkicikler plastik kaplara aktarılmış ve naylon poşet ile sarılmış.





Şekil 3b. Plastik poşet kaldırılmış bitkiler uzaktan ve yakından görüntüsü.

Şekil 4a. Bitki plastik kaptan çıkartılmış ve saksıya aktarılmak üzere hazırlanıyor.



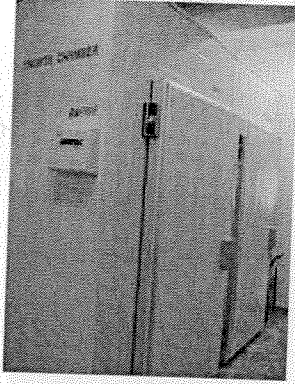
Şekil 4b. Bitki saksıya ekiliyor.



Şekil 4c. Ekilmiş bitki sulanıyor.



Şekil 5a. Tam teşekküllü büyütme odasının dıştan görünüşü.



Şekil 5b. Büyütme odasında PVX testlemesi için hazır bitkiler.



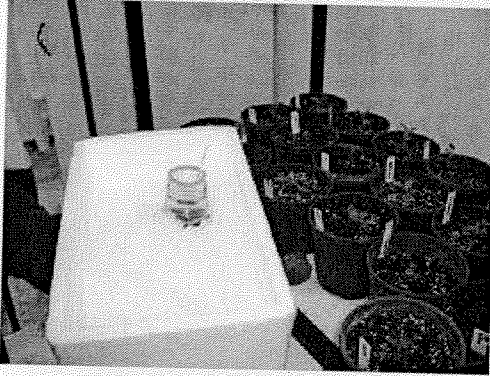
3.4. Virüs Kaynağı

PVX orijinal olarak *S. tuberosum* aksesyonu (accessionu) PI 257534 izole edilmiştir (GRIFFITHS ve ark. 1990). Bitkilerdeki PVX seviyesi, enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) tekniği ile test edilmiştir. PVX izolatu Laura Miller (Cornell University)'den sağlanmıştır.

3.5. Mekanik İnokulasyon

Genç patates bitkileri yaklaşık olarak 4-6 yaprak seviyesinde iken (*in vitro* bitkiçikler 4 haftadan az saksılara aktarıldıktan sonra) mekanik olarak inoküle edilmişlerdir. İnokulasyondan bir gün önce ve bir gün sonra bitkiler büyütme odasında ışıklar kapatılarak karanlıkta bırakılmıştır. Her genotipten 6 bitki PVX ile inoküle edilmiş ve deney 2 set halinde yapılmıştır. PVX inokulum kaynağı olarak çoğaltılmış patates yaprakları toplanılmış ve havan-havaneli kullanılıp iyice ezilerek bitki özsu alınmıştır. Alınan bitki özsu fosfat tamponu kullanılarak 1:5 oranında seyreltilmiştir. Fosfat tamponu, 1L distile su içerisinde 1,47 mM KH_2PO_4 ve 8,1 mM Na_2HPO_4 -susuz çözülerek pH 7,4'e ayarlanıp kullanılmıştır. Seyreltme yapılırken fosfat tamponunun +4°C olmasına dikkat edilmiştir. Seyreltilmiş inokulum kaynağı buz üzerine konularak inokulasyonlar yapılmıştır (Şekil 6).

Şekil 6. Seyreltilmiş inokulum kaynağı buz üzerinde.



İnokulasyondan önce, karşılıklı seçilen iki yaprak yüzeyine hafifçe carborundum serpilmiştir (Şekil 7). Pamuklu çubuk ile yaprak yüzeyine inokulum kaynağı iyice sürülmüştür ve karşılıklı küçük iki delik açılarak işaretlenmiştir (Şekil 8a ve 8b).

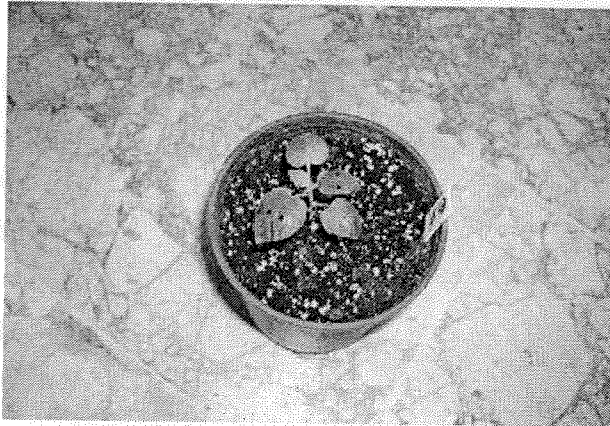
Şekil 7. Bitkilere karborandum serpilirken



Şekil 8a. İnokule edilen yapraklar işaretlenirken



Şekil 8b. İnokule edilmiş yaprak işaretlenmiş.



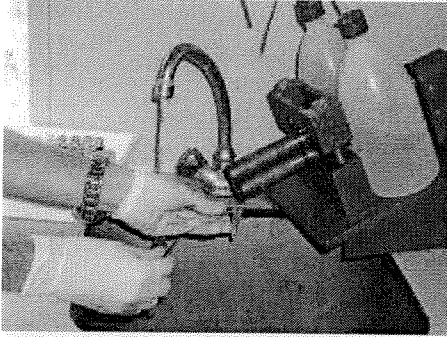
Negatif kontrol olarak her genotipten bir bitki ve tütün bitkileri sadece fosfat tamponu ile inokule edilmiştir. Benzer şekilde tütün ve dayanıksız patates bitkileri de pozitif kontrol olarak inokule edilmiştir. İnokülasyondan yarım saat sonra bütün bitkiler fazla karborondan ve virüslerden temizlenmesi için su ile yıkanmıştır.

3.6.Fenotipik Karakterizasyon

İnokule edilmiş yapraklar inokulasyondan 15 gün sonra toplanmış ve ELISA yapılarak inokülasyonun başarılı olup olmadığı belirlenmiştir.

İleri sistemik (inokule edilmeyen) yapraklar ise inokule edilen yaprakların 2-3 yaprak üstündeki yaprakların alınmasıyla inokulasyondan bir ay sonra toplanarak DAS-ELISA metodu (Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ile CLARK ve ADAMS (1977)'in önerdiği şekilde test edilmiştir. Agdia firmasından sağlanan PVX'e spesifik poliklonal antikor ve alkaline fosfataz konjugated antikorlar kullanılmıştır.

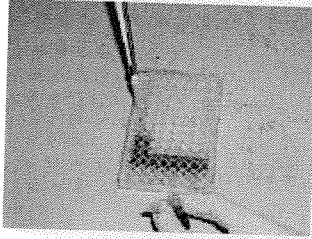
Şekil 9. Bitki yaprakları eziliyor ve ekstraksiyon tamponu içerisine alınıyor.



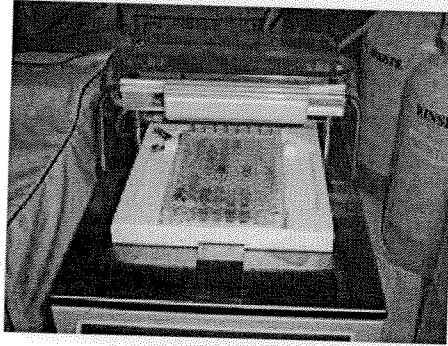
Toplanan bitki yaprakları merdane yardımı ile ezilerek suyu alınmış ve yaprak suyu 1:10 oranında (2 damla yaprak suyu:900 µl ekstraksiyon tamponu) ekstraksiyon tamponu içerisinde seyreltilmiştir (Şekil 9). Ekstraksiyon tamponu 1L PBST tamponu içerisinde 20g PVP (polyvinilprolidon), 1,3 g Na₂SO₃-susuz, 0,2 g NaN₃, 2g albumin, 20g Tween-20 çözülüp, pH7,4'e ayarlanarak kullanılmıştır. Kaplama tamponu, 1L distile su içerisinde 1,59g Na₂CO₃, 2,93g NaHCO₃, 0,2g NaN₃ çözülüp pH 9,6'ya ayarlanarak hazırlanmıştır. PVX virüsüne özgü capture anti-PVX antikor 1:200 oranında kaplama tamponu içerisinde seyreltilmiştir. ELISA tabağı (Nunc-Immuno

Plates MaxiSorp F96, Bioreba) her bir kuyucuğa 100 µl kaplama tamponuyla seyreltilmiş spesifik antikor yüklenerek kaplanmıştır. Tabaklar, streç film ile sıkıca sarılmış ve nemli bir bezin arasına konulup kapaklı bir kutu içerine yerleştirilerek 16 saat 4° C'de bekletilmiştir. 16 saat sonra tabaklar dört kere yıkama tamponu (PBST) ile Mikroplaka-Yıkayıcı (ASYS Hitech GmbH-Atlantis) cihazında yıkanmıştır. Bioreba firmasından hazır olarak alınan toz halindeki yıkama tamponu, 1L distile su içerisinde 10g çözülerek hazırlanmıştır. Ekstraksiyon tamponu içinde seyreltilen ve buz üzerinde muhafaza edilen yaprak öz suları (antijen) 'ndan her bir kuyucuğa 100 µl yüklenmiştir (Şekil 10). Tabaklar, streç film ile sıkıca sarılmış ve nemli bir bezin arasına konulup kapaklı bir kutu içerine yerleştirilerek 16 saat 4 °C'de bekletilmiştir. 16 saat sonra tabaklar tekrar dört kere yıkama tamponu (PBST) ile Mikroplaka-Yıkayıcı (ASYS Hitech GmbH-Atlantis) cihazında yıkanmıştır (Şekil 11).

Şekil 10. Bitki öz sularının her bir kuyucuğa yüklenmesi.



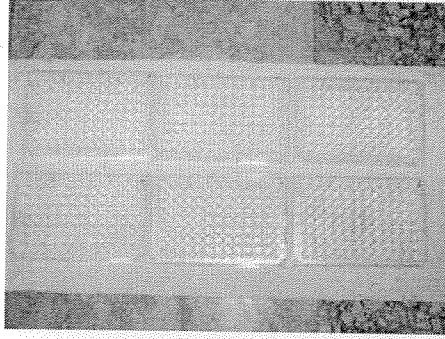
Şekil 11. ELISA tabak mikroplaka yıkayıcısında yıkılıyor.



Alkaline-fosfataz-konjugated anti-PVX antikorunu 1:200 oranından konjugasyon tamponu içerisinde seyreltilmiştir. Tabaktaki her bir kuyucuğa 100 µl yüklenmiştir. Tabaklar, streç film ile sıkıca sarıldı ve nemli bir bezin arasına konulup kapaklı bir kutu içerine

yerleştirilerek 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. 2 saat sonra tabaklar tekrar dört kere yıkama tamponu (PBST) ile Mikrolaka-Yıkayıcı (ASYS Hitech GmbH-Atlantis) cihazında yıkanmıştır. Her bir kuyucuğa p-nitrofenilfosfat substrat solüsyonundan (Agdia) 100 µl yüklenmiş ve tabaklar yine aynı şekilde kapaklı kutu içerisine konularak 30-60 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir (Şekil 12). Tabaklardaki renk değişikliği Mikrolaka-Okuyucu (Thermolabsystems-MultiskanEX) cihazı ile fotometrik olarak 630 nm’de ölçülmüştür. Pozitif ve negatif kontroller Agdia firmasından sağlanmıştır. Negatif kontrol için seçilen bitkilerin ELISA sonuçlarının ortalamasının iki katı pozitif yani hasta olarak kabul edilmiştir.

Şekil 12. ELISA tabaklarında renk değişikliği.



3.7. Genotipik Karakterizasyon

Her bir genotipten DNA’lar FULTON ve ark. (1997) tarafından tanıtılan yöntemle göre çıkarılmıştır. Çalışmada kullanılan BCT popülasyonu için daha önce yapılan çalışmalarda RFLP işaretleyicileri ile düşük çözünürlükte de olsa bir genetik bağlantı haritası oluşturulmuştur (BONIERBELA ve ark., 1994). Ancak bu haritada sadece 58 RFLP işaretleyicisi olduğu için patates genomunun tamamını temsil etmemektedir ve üzerinde çalışılan PVX dayanıklılık geninin haritalanması çalışmaları için yeterli değildir. Bu nedenle bu popülasyonun diğer işaretleyici sistemleri ile karakterize edilmesi gerekmiştir. Çalışmada, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism = Çoğaltılmış Parçacık Uzunluğu Polimorfizmi) işaretleyicileri PVX için patates dayanıklılık geninin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Haritalama çalışmasında kullanılan bütün metodlar PCR’a dayalıdır. Her bir işaretleyici polimorfik olup olmadıklarını testlemek için öncelikle anaç (HH1-9 ve

BIIA) DNA'larında testlenmiştir. Sadece anaçlarda polimorfik bulunan işaretleyiciler haritalama popülasyonunda uygulanmıştır.

AFLP analizleri için öncelikle ekstrakte edilen BCT popülasyonuna ait DNA'lar restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Kesim için 5 µl DNA (~250 ng), 5 µl 5x reaksiyon tamponu, 2 µl *EcoR I*/*Mse I* ve 13 µl steril dH₂O 1,5 µl'lik mikrosantrifüj tüpü içerisine konulmuş ve 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra restriksiyon endonükleazların aktivitesini durdurmak için aynı karışım 70°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. İkinci basamakta, 24 µl adaptör bağlama solüsyonu ve 1 µl T4 DNA ligaz, DNA karışımına eklenmiş ve 20°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Bu bağlama solüsyonu 1:10 oranında TE tamponu ile seyreltilmiştir (10 µl karışım + 90 µl TE tamponu). Üçüncü basamakta, önçoğaltma (preamplification) reaksiyonu yapılmıştır; 40 µl pre-amp primer karışımı, 5 µl ikinci basamaktaki seyreltilmiş kalıp DNA, 5 µl 10x PCR tamponu (Mg içeren) ve 1 µl *Taq* DNA polimeraz 0,6 ml'lik mikrosantrifüj tüpü içerisine eklenmiştir. Bu karışım; 94°C/30 sn., 56°C/1 dk., 72°C/1 dk. tutularak 20 tur amplifiye edilmiştir. Çıkan PCR ürününden 3 µl alınmış ve 147 µl TE tamponu ile seyreltilmiştir. Son basamakta seçici AFLP çoğaltımı (amplifikasyonu) yapılmıştır. 2,5 µl etiketlenmiş *EcoR I* primeri, 1,5 µl *Mse I* primer(dNTP içeren), 2 µl 10x PCR tamponu (Mg içeren), 0,1 µl *Taq* DNA polimeraz ve 80 µl steril dH₂O karışımı hazırlanmıştır. PCR tüpleri içerisine üçüncü basamakta elde edilen PCR ürününden 5 µl konulmuş ve üzerine de karışımdan 15 µl eklenmiş ve 94°C/30 sn., 65°C/30 sn., 72°C/60 sn. 1 tur; sonra her turda bağlanma sıcaklığı 0,7°C düşecek şekilde toplam 12 tur, son olarak 94°C/30 sn., 56°C/30 sn., 72°C/1 dk. 23 tur tutularak çoğaltılmıştır. PCR'dan sonra iki seyreltme daha yapılmıştır. İlk olarak PCR ürünü 1:3 (7 µl PCR ürünü + 14 µl dH₂O) oranında su ile seyreltilmiştir. Daha sonra sekanslama mikropalakası içerisine, bu solüsyondan 3 µl alınarak üzerine 27 µl Örnek Yükleme Solüsyonu (SLS) ve 0,5 µl size standart 600 eklenerek 1:10 oranında seyreltme yapılmıştır. Bu solüsyon üzerine 1 damla mineral yağ damlatılarak buharlaşması önlenmiştir ve CEQ 8800 Genetik Analiz Sistemi cihazı'na yerleştirilerek kapillar olarak yürütülmüştür. Frag-4 metodu AFLP analizleri (ayırışma 90 °C, 120 saniye; capillary 50 °C; injeksiyon 2.0 kV, 30 saniye; ayırışma 4.8 kV, 60 dakika) için kullanılır. Bu aşamadan sonra, sonuçlar Tablo 3 de verilen parametrelere göre istenmeyen veya düşük kalite örnekleri çıkarmak için filtrelenir. Toplam olarak 11 primer kombinasyonu denenmiştir. Kombinasyonlar Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2: AFLP'de uygulanan primer kombinasyonları

Primer Kombinasyonu	<i>EcoRI</i>	<i>MseI</i>	Üretilen Parçacık Sayısı
1	E-AAC	M-CAG	70
2	E-AAG	M-CAC	99
3	E-ACA	M-CAG	90
4	E-ACA	M-CTG	38
5	E-ACC	M-CAA	76
6	E-AGG	M-CAG	84
7	E-ACC	M-CTA	72
8	E-ACG	M-CAA	66
9	E-AGC	M-CAA	75
10	E-ACT	M-CTT	80
11	E-ACT	M-CAT	63

Tablo 3. AFLP analizleri için filtreleme parametreleri

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

Toplam 813 AFLP lokusu ve 58 RFLP işaretleyicisi genetik haritalama çalışmalarında kullanılmıştır.

4.BULGULAR

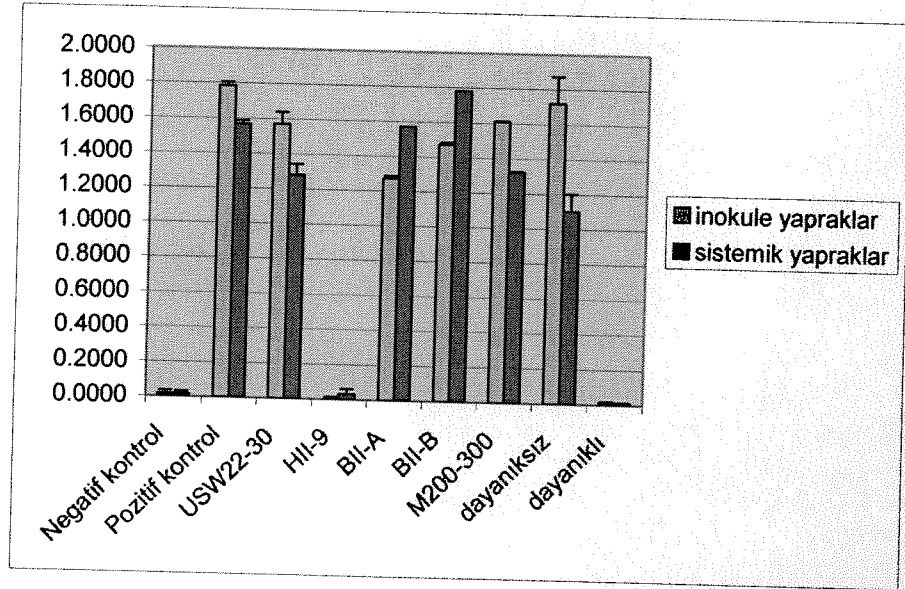
Çalışma 1 Mayıs 2005 tarihinde resmen başlatılmıştır. İlk altı aylık süreç içerisinde, çalışmanın virüs testleri ve gen haritalama çalışmaları için gerekli bitki materyali ve alet ekipmaların temin edilmiştir. Ayrıca, bu süreç içerisinde projede kullanılacak diğer sarf malzemeler ve kitler de satın alınmıştır. Her bir genotipten en az 6 bitki testlemelerde kullanılmıştır ve denemeler iki kez tekrarlanmıştır. Denemede kullanılan hatların PVX virüsüne reaksiyonları ELISA testi ile belirlenmiştir.

4.1.PVX İnokulasyonundan Elde Edilen Sonuçlar

Şekil 13' de denemede kullanılan BCT popülasyonu ve anaç bitkilerinin PVX ile mekanik inokulasyonu sonucu elde edilen ELISA sonuçları gösterilmiştir. ELISA

değerleri 2 ve 4 haftalık inokule edilmiş bitki örneklerinden alınan ortalama değerlerdir. Örnekler eğer $OD > 0.05$ üzerinde ise pozitif olarak (duyarlı) değerlendirilmiştir. Şekil 1'de ilk sütunlar inokule edilen yapraklar ikinci sütunlar ise sistemik yapraklardan elde edilen ELISA sonuçlarını göstermektedir. Standart sapmalar sütunların üzerinde belirtilmiştir. Y eksenini ELISA değerlerini göstermektedir. X eksenini: negatif ve pozitif kontrol, ebeveynler ve projenin dağılımını göstermektedir. HII-9 nolu hat PVX'e dayanıklı olan ebeveynidir. Diğer hatlar (USW22-30, BII-A, BII-B, M200-300) ise duyarlı olan genotiplerdir.

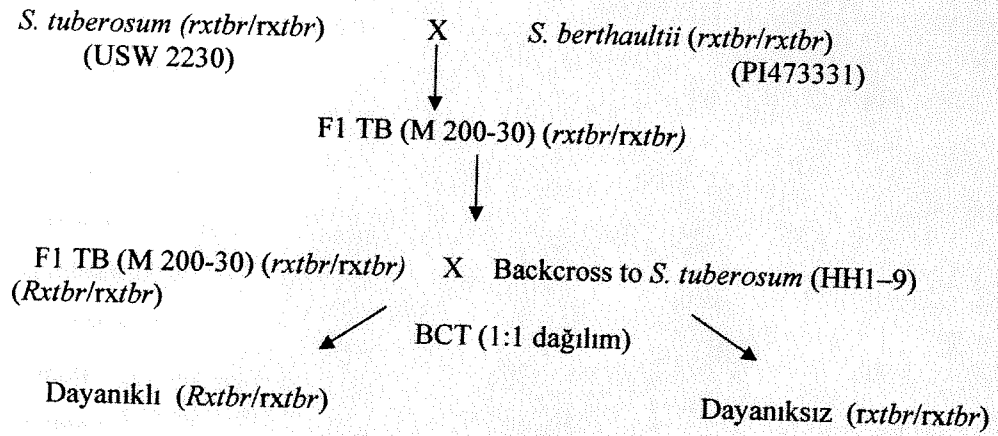
Şekil 13. BCT populasyonu ve anaç bitkilerinin PVX ile mekanik inokulasyonu sonucu elde edilen ELISA sonuçları



BCT populasyonundaki PVX virüsüne karşı belirlenen dayanıklılık şekli aşırı dayanıklılık (extreme resistance) olup virüs inokule edilen yapraklar da dahi çoğalamamaktadır. Virüs girdiği hücrelerde kalmış ve hücreler arasında hareket (cell to cell movement) edememiştir. Dayanıksız olan bitkilerde virüs hem inokule edilen yapraklarda ve hem de sistemik yapraklarda çoğalabilmiştir. PVX virüsünün patates bitkisindeki genel özelliği infekte ettiği yapraklarda herhangi bilinen bir semptom göstermemesidir. Bu durumda virüsün varlığı ELISA testi ile tespit edilmiştir.

BCT popülasyonu, anaç bitkiler ve kontrol bitkilerin ELISA sonuçları Şekil 14 te gösterilmiştir. Şekil 14 te görüldüğü gibi heterozigot bir ebeveynin homozigot resesif bir ebeveyn ile çaprazlandığında F1 da görülen sonuçlar 1:1 dağılım göstermektedir. Bu segregasyonda dominant tek gen için beklenen sonuçtur. Tablo 4 popülasyondaki dominant tek gen dağılımını göstermektedir.

Şekil 14. Popülasyonun yapısı



Tablo 4. Diploit patates popülasyonundan (*S. tuberosum* and *S. berthaultii*) oluşturulan BCT popülasyonunda PVX'e karşı dayanıklılık sonuçları.

Popülasyon değeri	Bitki sayısı		Beklenen oran	χ^2 değeri	P
	İmmün (dayanıklı)	Dayanıksız			
<i>S. tuberosum</i> (USW2230)	0	6			
<i>S. berthaultii</i> (PI473331)	0	6			
(T×B) F1M200-30	0	6			
<i>S. tuberosum</i> (HH1-9)	6	0			
<i>S. berthaultii</i> (B11-B)	0	6			
F1× <i>S. tuberosum</i> (HH1-9) (BCT)	68	55	1:1	1.37	0,24

BCT=backcross to *S. tuberosum*

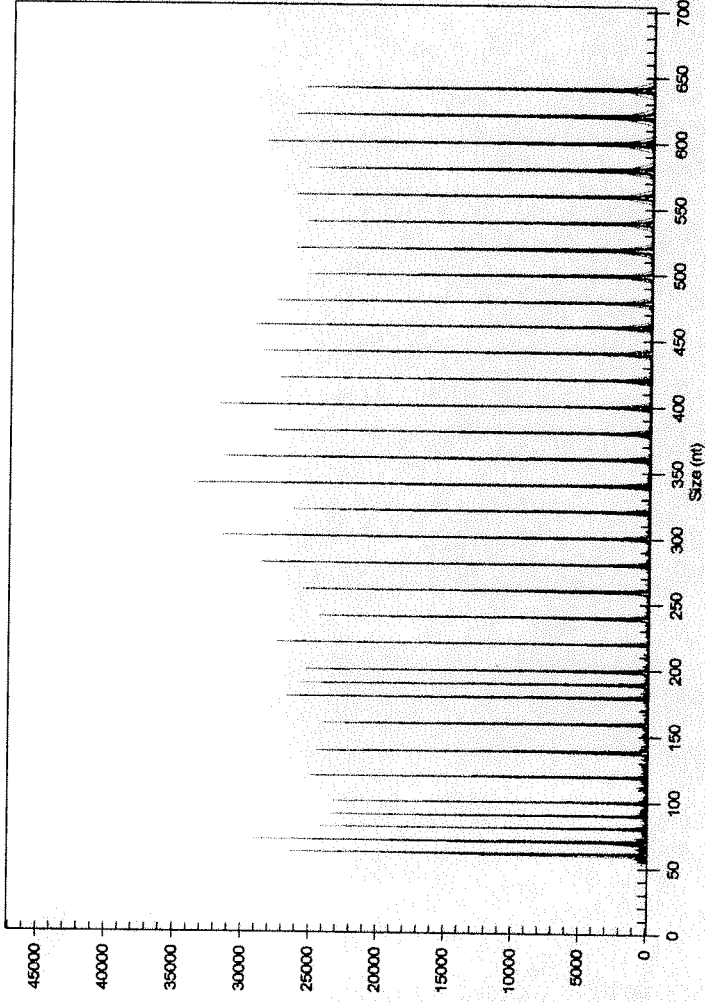
4.2.Moleküler Analiz

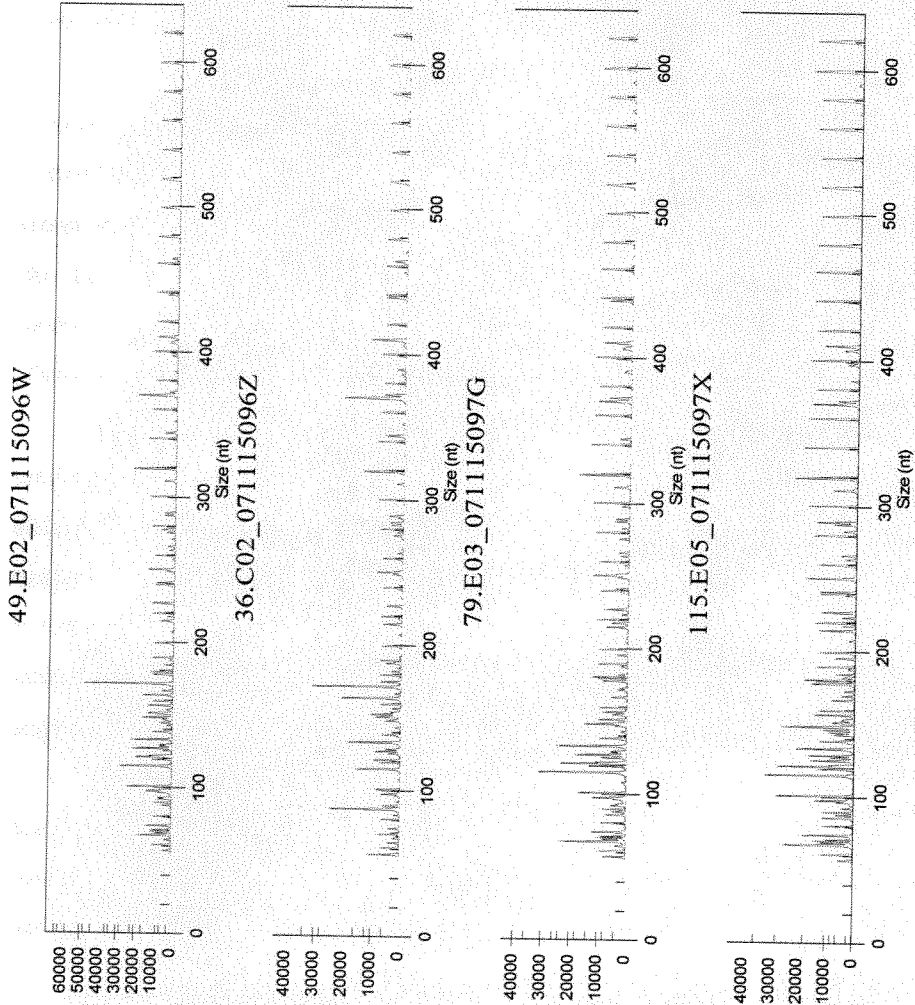
PVX dayanıklılığında rol oynayan genin belirlenmesi için, 123 bitkiden oluşan bir BCT popülasyonu kullanılmıştır. Bu popülasyon geri melez popülasyonu olup diploid bir yabancı tür *Solanum berthaultii* ve diploid bir *Solanum tuberosum* melezlemesinden türetilmiştir. (BONIERBALE ve ark., 1994). Toplam olarak 58 RFLP ve 11 AFLP primer kombinasyonu işaretleyicisi polimorfizm için testlenmiştir.

4.2.1.AFLP (Çoğaltılmış Parçacık Uzunluk Polimorfizm)

Bu çalışmada, 11 AFLP primer kombinasyonu kullanılmıştır (Tablo 2). Bu parçacıkların bazılarında ait temsili resimler Şekil 15, 16, 17'de verilmiştir. AFLP sisteminin yeniden üretilebilirliğinin kontrol edilmesi için, büyüklük standartları için overlay grafikleri yapılmıştır ve beklenen büyüklük standartları ile üst üste gelmeyen parçacıklara sahip örnekler analizlerden çıkarılmıştır (Şekil 15). 11 primer kombinasyonu için toplam olarak 813 band çoğaltılmıştır. E-ACA/M-CTG primer kombinasyonu en az bandı (38 band) verirken E-AAG/M-CAC kombinasyonu ise 99 bandla en çok band üreten primer kombinasyonu olmuştur. Toplam 813 band polimorfik bulunmuş ve genetik haritalama çalışmalarında kullanılmıştır. Bütün primer kombinasyonları için ortalama polimorfizm oranı %24.4'tür.

Şekil 15. Overlay grafiği bir primer kombinasyonunda kullanılan 94 örnek için standart büyüklüklerinin üst üste gelmesini göstermektedir.





Şekil 17. Bir AFLP primer kombinasyonu için dört örneğin AFLP sonuçlarının gösterildiği stacked grafiği

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada patates X potexvirüsüne karşı aşırı dayanıklılık, diploid haritalama (mapping) populasyonu *Solanum tuberosum* (BCT) da belirlenmiştir. Bu BCT populasyonundan 68 bitkinin hem virüs inokule edilen yapraklarında ve hem de sistemik yapraklarında ELISA ile virus tespit edilememiştir ve bitkiler semptom göstermemiştir. Buna karşılık 55 bitkide ve dayanıksız ebeveynlerde virüs hem inokule edilen hemde sistemik yapraklarda ELISA ile tespit edilmiş fakat bitkiler semptom göstermemiştir. Bu populasyondan elde edilen 1 (Dayanıklı):1 (hassas) oran buradaki dayanıklılığın tek bir dominant gen ile aktarıldığını önermektedir.

Bu konu ile ilgili daha önce yapılan çalışmalarda, PVX'e dayanıklılık sağlayan bazı genlerin patates genomundaki kromozomal bölgeleri belirlenmiştir. Bu genlerden *Rx1* ve *Rx2* aşırı dirençlilik sağlamak ve mevcut bütün PVX izolatlarına karşı dayanıklılık gösterebilmektedir (COCKERMAN, 1970) ve ayrıca bu genler patatesin V. ve XII. kromozomlarında haritalanmıştır (RITTER ve ark., 1991). Farklı bir haritalama populasyonun da *Rx* geni ise yine patatesin 12. kromozomunda haritalanmıştır (BENDAHMANE ve ark., 1997). Aşırı dayanıklılık genleri daha önce ki başka çalışmalarda kromozom XI da haritalanmıştır (BRIGNETI ve ark., 1997; HAMALAINEN ve ark., 1997). Bu haritalanan genlerin tek dominant gen ile kontrol edildiğini göstermişlerdir. Dahası patateste aşırı dayanıklılık genlerinin kalıtımı tek bir dominant gen ile kalıtıldığı gösterilmiştir (RITTER ve ark., 1991).

BCT populasyonunda PVX'e karşı olan dayanıklılık: aşırı dayanıklılık (immünite) şeklindedir çünkü virüsün bitkideki hareketi sadece sistemik değil aynı zamanda girdiği hücrede kalacak şekilde engellenmiştir. Aynı benzer sonuçlar BRIGNETI ve ark., (1997) tarafından da gösterilmiştir. Bundan daha önceki tarihte yapılan başka bir çalışmada, BARKER ve HARRISON (1984) aşırı dayanıklı patates kültürvarları ile dayanıksız olan kültürvarlarda protoplast inokulasyon sonuçları aşırı dayanıklı olan patateslerde virüs çoğalması çok çok düşük olduğunu göstermiştir.

BRIGNETI ve ark. (1997) aşırı dayanıklı olan bitkilerdeki mekanizma konusundaki önerileri: ya virüs çoğalması baskılanmakta yada virüsü hücre içerisindeki dayanıklılığı azaltılmaktadır. Bundan dolayı bu çalışmada elde edilen PVX'e aşırı dayanıklılık geni kültüre edilmiş patateslere aktarılabilir ve patateste aşırı ürün kaybının engellenmesinde değerli katkılar sağlayabilir.

Moleküler çalışmalar için RFLP ve AFLP işaretleyicileri kullanılmıştır. RFLP verileri daha önceki çalışmalardan elde edilmiştir. AFLP analizleri bu proje kapsamında yapılmıştır. Toplam 11 AFLP primer kombinasyonu kullanılmış ve kombinasyonlardan toplam 813 skorlanabilen bandlar üretilmiştir. Genetik analizlerde genotipik veri olarak RFLP ve AFLP çalışmalarından elde edilen bilgiler kullanılmıştır. Fenotipik veri olarak ise BCT populasyonunun PVX virüsü ile inokülasyonu sonucu ELISA analizleri ile elde edilen veriler kullanılmıştır. Bu veriler (genotipik ve fenotipik) Qgene (NELSON, 1997) programı kullanılarak ilişkilendirilmiştir. Bu analizler sonucunda toplam 17 moleküler işaretleyici dayanıklı kaynak HH1-9 dan gelen PVX dayanıklılığı ile değişen oranlarda ilişkili bulunmuştur. Bu işaretleyiciler arasında 15 AFLP lokusu ve 2 adet RFLP lokusu yer almaktadır. Her iki RFLP lokusu da ikinci kromozom üzerinde yer almaktadır. En önemli işaretleyici olarak EACTMCTT140 ($P=0.0002$) lokusu bulunmuştur ve PVX dayanıklılığı için toplam fenotipin %20 sini açıklamaktadır ve HH1-9 alleli dayanıklılığı arttırmaktadır. Diğer önemli üç işaretleyici (EACTMCTT408 (13%), EACTMCTT202 (12%) ve EACTMCTT176 (10%) fenotip üzerinde en az %10 luk bir etki göstermektedir. Geriye kalan lokuslar ise daha küçük etkiler göstermiştir. Genetik analiz sonuçları Tablo 5 de verilmiştir. Bu çalışmada belirlenen EACTMCTT140 nolu işaretleyici CAP (Cleaved Amplified Polymorphism) işaretleyicisine dönüştürüldüğünde patatada PVX dayanıklılığı için moleküler işaretleyiciye dayalı seleksiyon çalışmalarında kullanılabilir.

Tablo 5. PVX dayanıklılığı ile bağlantı halinde olan moleküler işaretleyiciler. R^2 her bir lokusun toplam fenotip (ELISA analizleri sonucunda elde edilen PVX dayanıklılığı) üzerindeki etkisini göstermektedir. AA ve Aa alleleri herbir lokus için homozigot ve heterozigot bireylerin fenotipik ortalamalarını vermektedir.

Marker	P-value	R^2 (%)	AA	Aa
EACTMCTT140	0.0002	20	0.45	1.71
EACTMCTT408	0.0031	13	0.52	1.91
EACTMCTT202	0.0042	12	0.51	1.72
EAACMCAG125	0.0069	9	0.46	1.04
EAAGMCAC544	0.0089	9	0.46	1.07
EACTMCTT176	0.0106	10	0.48	1.28
EACTMCTT131	0.0176	9	0.48	1.17
CT75	0.0232	6	0.34	0.83
EAAGMCAC258	0.0243	6	0.47	0.98
EACTMCTT608	0.0339	7	0.54	1.55
EAGGMCAG542	0.0373	5	0.62	1.63
EACTMCTT207	0.0408	6	0.48	1.03
TG276	0.0433	5	0.39	0.83
EACTMCTT82	0.0441	6	0.46	0.98
EAGGMCAG493	0.0461	5	0.65	2.55
EACCMCA353	0.0483	5	0.48	0.9
EACTMCAT174	0.0489	5	0.62	1.25

6.YARARLANILAN KAYNAKLAR

- AGRIOS, G. N. Plant Pathology, 4th edn. Academic Press Inc. San Diego, (1997). Pp:502.
- BAMBERG, J. and del RIO, A., Conservation of Potato Genetic Resources. Genetic Improvement of Solanaceous Crops. Ed: Razdan, M. K., and Mattoo, A.K., Vol: 1, Science Publisher, Inc. Enfield, NH, USA. (2005). Pp.1
- BEEEMSTER, A. B. R., Virus Translocation and Mature-plant Resistance in Potato Plants, ed:J. A. de Bokx, and J. P. H. van der Want, Viruses of Potatoes and Seed-Potato Production, 116-125. PUDOC, Wageningen, (1987).
- BENDAHMANE, A., Kanyuka, K., and Baulcombe, D. C., High Resolution Genetical and Physical Mapping of the Rx Gene for Extreme Resistance to Potato Virus X in Tetraploid Potato. Theor. Appl. Genet., 95, 153-162, (1997).
- BENDAHMANE, A., Kanyuka, K., and Baulcombe, D. C., The Rx Gene from Potato Controls Separate Virus Resistance and Cell Death Responses. The Plant Cell, 11, 781-791, (1999).
- BARKER, H., and Harrison, B. D., Expression of Genes for Resistance to Potato Virus Y in Potato Plants and Protoplasts. Ann. Appl. Biol., 105, 539-545, (1984).
- BONIERBALE, M. W., Plaisted, R. L., Pineda, O., and Tanksley, S. D., QTL Analysis of Trichome-mediated Insect Resistance in Potato. Theor. Appl. Genet. 87, 973-987, (1994).
- BOLAT, B.. Report on Potato Production in Turkey. International Potato Course. IAC. Wageningen, Netherlands. (1979).
- BRIGNETI, G. , Garcia-Mas, J., and Baulcombe, D. C., Molecular Mapping of the Potato Virus Y Resistance Gene Rysto in Potato. Theor. Appl. Genet., 94, 198-203, (1997).
- CADMAN, C. H., Autotetraploid Inheritance in the Potato: Some New Evidence. J. Genet, 44, 33-52, (1942).
- CLARK, M. F. and Adams, A. N., Characteristics of the Microplate Methods of Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. J. Gen. Virol. , 34, 475-483, (1977).
- COCKERHAM, G., Some Genetical Aspects of Resistance to Potato Viruses. Ann. Appl. Biol., 32, 280-281, (1945).
- COCKERHAM G Strains of potato virus X. In: E. Streutgers, ABR Beenster, N Noordam, JPH van der Want (eds.) Proc 2 nd Conf Potato Virus Dis. H. Veenman & Zonen, Wageningen, The Netherlands, (1955). pp:89-92.
- COCKERHAM, G., Experimental Breeding in Relation to Virus Resistance. Proc. 3rd Conf. Pot. Virus Dis., Lisse-Wageinigen, 199-203 (1958).

- COCKERHAM, G., Genetical Studies on Resistance to Potato Viruses X and Y. *Heredity*, 25, 309-348, (1970).
- FULTON T. M., CHUNWONGSE J., TANKSLEY S. D., Microprep protocol for extraction of DNA from Tomato and other herbaceous plants, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 13:207-209, (1995).
- GRIFFITHS, H. M., Slack, S. A., and Dodds, J. H., Effect of Chemical and Heat Therapy on Virus Concentrations in *in vitro* Potato Plantlets. *Can. J. Bot.* 68:1515-1521, (1990).
- HAMALAINEN J.H., Watanabe K.N., Valkonen J.P.T., Arihara A., Plaisted R.L., Mapping and Marker-assisted Selection for a Gene for Extreme Resistance to Potato Virus Y. *Theor Appl Genet* 94:192-197, (1997).
- HAVERKORT, A., Potato Production in Turkey, and its Improvement in the Gudalan Valley. International Potato Center (Region IV), and The Turkish National Potato Research and Training Programme, Menemem, Turkey. (1981). pp. 35.
- HOOVER, J. W., Resistance to Certain Viruses in Potato. Rep. Plan Conf. Devel. Control Potato Viruses, CIP, Lima, Peru, 63-73, (1977).
- LIVINGSTONE, KD, Lackney VK, Blauth JR, van Wijk R, and Jahn MK Genome mapping in Capsicum and the evolution of genome structure in the Solanaceae. *Genetics* 152: 1183-1202. (1999).
- NELSON J. C., QGENE: software for marker-based genomic analysis and breeding, *Molecular Breeding*, 3:239-245, (1997).
- RITTER, E., Debener, T., Barone, A., Salamini, F., and Gebhardt, C., RFLP Mapping on Potato Chromosomes of Two Genes Controlling Extreme Resistance to Potato Virus X (PVX). *Mol. Gen. Genet.*, 227, 81-85, (1991).
- ROSS, H., Potato Breeding – Problems and Perspectives. *J Plant Breed Suppl* 13. (1986), pp:132.
- SANFORD, J.C. and Hanneman, R.E., Intermating of Potato Haploids and Spontaneous Sexual Polyploidization-effects on Heterozygosity. *Am. Potato. J.*, 59, 407-414, (1982).
- TANKSLEY, SD, Ganai MW, Prince JP, deVicente MC, Bonierbela MW High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132: 1141-1160. (1992).
- VALKONEN, J.P.T., Jones, R.A.C., Slack, S.A., and Watanabe, K.N., Resistance specificities to virus in potato:Standardization of nomenclature. *Plant Breeding* 115:433-438. (1996).

<http://www.kkgm.gov.tr>

<http://www.uga.edu/vegetable/potato.html>

<http://www.tagem.gov.tr>

<http://www.afyontarim.gov.tr>

<http://www.toros.com.tr>

**TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje No:104T284
Proje Başlığı: <i>Solanum tuberosum</i> populasyonunda patates X virüs 'üne (PVX) karşı dayanıklılığı kontrol eden genlerin belirlenmesi ve moleküler haritalanması
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Yard. Doç. Dr. Fevziye ÇELEBİ-TOPRAK, Doç. Dr. Anne FRARY, Doç. Dr. Sami DOĞANLAR, Eminur BARUTÇU
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Pamukkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kınıklı Merkez Kampus Kınıklı, Denizli 20017
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Gülbahçe Kampusu, Urla, İzmir
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01/05/2005 – 01/05/2008
Öz (en çok 70 kelime) <p>Bu çalışmada patates X potexvirüsüne karşı aşırı dayanıklılık <i>Solanum tuberosumdan</i> (HH1-9) (BCT) oluşan populasyonda belirlenmiştir. Sonuçlar Ki-kare ile test edildiğinde 1:1 oranda $p=0,24$ heterozigot dayanıklı ebeveyninden elde edilmiş populasyonda beklenen sonuçları vermiştir. Dayanıklılık tek gene kontrol edilmektedir.</p> <p>Elimizdeki veriler (genotipik ve fenotipik) Qgene programı kullanılarak analiz edilmiştir ve analizler sonucunda toplam 17 moleküler işaretleyici dayanıklı kaynak HH1-9 dan gelen PVX dayanıklılığı ile değişen oranlarda ilişkili bulunmuştur. Bu markırlar ikinci kromozom üzerinde yer almaktadır.</p>
Anahtar Kelimeler: PVX, dayanıklılık, patates, immunité
Projeden Yapılan Yayınlar: 19. Ulusal Biyoloji Kongresi 23-27 Haziran 2008 Poster sunumu ektedir.