



T.C.
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL GENETİK MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

PATATES ISLAH HATLARINDA PATATES Y VİRÜSÜNE DAYANIKLILIĞIN
MOLEKÜLER MARKÖRLER İLE TARANMASI

VİRDEV S BALLI

Mayıs 2019

T.C.
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL GENETİK MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

PATATES ISLAH HATLARINDA PATATES Y VİRÜSÜNE DAYANIKLILIĞIN
MOLEKÜLER MARKÖRLER İLE TARANMASI

VİRDEVŞ BALLI

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Doç. Dr. Ufuk DEMİREL

Mayıs 2019

Virdevs BALLI tarafından Doç. Dr. Ufuk DEMİREL danışmanlığında hazırlanan “Patates Islah Hatlarında Patates Y Virüsüne Dayanıklılığın Moleküler Markörler ile Taranması” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Genetik Mühendisliği Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Mehmet ARSLAN, Erciyes Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Mehmet Emin ÇALIŞKAN, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Ufuk DEMİREL, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/....../20.... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu’nun/....../20.... tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../20...

Doç. Dr. Murat BARUT
MÜDÜR

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Virdevs BALLI

ÖZET

PATATES ISLAH HATLARINDA PATATES Y VİRÜSÜNE DAYANIKLILIĞIN MOLEKÜLER MARKÖRLER İLE TARANMASI

BALLI, Virdevs

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Genetik Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman

: Doç. Dr. Ufuk DEMİREL

Mayıs 2019, 115 sayfa

Tohumluk yumru üretiminde en önemli virüs etmeni olan PVY için alınabilecek kültürel önlemlerin çözüm olmamasından dolayı dayanıklı bitkilerin geliştirilmesi üzerinde durulmuştur. Moleküler markörler kullanılarak dayanıklılık genleri kolay ve kısa sürede haritalanmakta ve klonlanmaktadır. Böylece dayanıklı ve hassas çeşitler moleküler markörlerle taranmakta ve bu genlerin bulunduğu genotipler belirlenmektedir. Bu tez çalışmasında, 435 patates ıslah hattı STM0003 ve RYSC3 moleküler markörleri kullanılarak PCR koşullarında taranmış ve elde edilen PCR ürünleri kapiler elektroforez yöntemiyle analiz edilmiştir. PVY'ye dayanıklı ve hassas olduğu bilinen genotiplerle yapılan çalışma sonucunda, STM0003 ve RYSC3 moleküler markörlerini kullanılarak dayanıklı genotiplerin %78'i doğru bir şekilde belirlenmiştir. Bunun yanında hassas genotipler %67 oranında bir doğrulukla tespit edilmiştir. Genel olarak, patates genotiplerinin PVY'ye dayanıklılık ve hassasiyet durumlarının moleküler markörlerle tahmin başarısı % 72 düzeyinde olmuştur. Tez kapsamında incelenen patates ıslah hatlarının 168 tanesinin PVY'ye dayanıklı, 208 tanesinin ise hassas olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, STM0003 ve RYSC3 markörlerinin patates ıslah programına entegre edilmesi durumunda, PVY'dayanıklı hatların çok önemli bir kısmı ıslah programının erken dönemlerinde belirlenebilecektir.

Anahtar Sözcükler: *Solanum tuberosum*, PVY, PCR, Moleküler markörler

SUMMARY

SCREENING OF POTATO BREEDING LINES FOR PVY RESISTANCE USING MOLECULAR MARKERS

BALLI, Virdevs

Nigde Ömer Halisdemir University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Agricultural Genetic Engineering

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Ufuk DEMİREL

May 2019, 115 pages

The most important virus in seed tuber production is PVY. Therefore, the development of virus resistant plants is emphasized in current studies. In order to develop this virus resistant plant varieties, some resistant genes are used. By using molecular markers, these genes can be easily mapped and cloned. These resistance genes can be transferred to sensitive plants and plants with desired traits can be obtained. Therefore, tolerant and sensitive varieties can be screened with molecular markers and the varieties having these genes can be determined. In this study 435 potato breeding lines were screened by PCR using STM0003 and RYSC3 molecular markers, and the PCR products were analyzed by capillary electrophoresis method. As a result of the study using PVY resistant and sensitive genotypes, STM0003 and RYS3 molecular markers accurately defined 78% of the resistant genotypes. In addition, 67% of the sensitive genotypes was precisely described. In general, estimation success of the molecular markers for PVY resistance and sensitivity of genotypes was 72%. While 168 genotypes were considered as PVY resistant, 208 were sensitive. Consequently, in case of integration of STM0003 and RYS3 markers with potato breeding programs, most of resistant lines would be identified in the early stages of the breeding programs.

Keywords: *Solanum tuberosum*, PVY, PCR, Molecular markers

ÖN SÖZ

Yüksek lisans eğitimim sırasında tecrübe ve fikirlerinden faydalandığım, bu tezin konusunun belirlenmesinde, laboratuvar çalışmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ufuk DEMİREL'e ıslah hatlarının temininde yardımlarından ve desteğinden dolayı sayın Prof. Dr. Mehmet Emin ÇALIŞKAN'a ve Doğa Tohumculuğa teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını benden esirgemeyen sevgili arkadaşım Buse Leyla CİHANGİROĞLU'na, Arş Gör. İlknur TINDAŞ ve Arş Gör. Caner YAVUZ'a tezimin yapım ve yazım aşamasında yardımını esirgemeyen arkadaşım Ziraat Yüksek Mühendisi Hasibe YILDIZ'a, Ziraat Yüksek Mühendisi Yakup SALGUT'a ve her zaman yanımda olup maddi manevi destek olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
SUMMARY	v
ÖN SÖZ	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR	xi
BÖLÜM I GİRİŞ	1
BÖLÜM II GENEL BİLGİLER	5
2.1 Patates Y Virüsü (PVY)	5
2.2 PVY Semptomları	7
2.3 Moleküler Markörler	9
BÖLÜM III MATERYAL VE METOT	13
3.1 Bitki Materyali ve Kullanılacak Markörler	13
3.2 Yaprak Örneklerinin Toplanması ve DNA İzolasyonu	16
3.2.1 Örnek dokularının TissueLyser ile parçalanması	16
3.2.2 CTAB ekstraksiyon tamponunun hazırlanması	16
3.2.3 DNA izolasyonu	17
3.2.3.1 DNA izolasyonu protokolü	18
3.2.4 Genomik DNA miktarının spektrofotometre ile tespit edilmesi	18
3.2.5 Genomik DNA'nın kalitesinin jel elektroforezi ile tespit edilmesi	19
3.2.5.1 TBE (1 litre) hazırlanması	19
3.2.5.2 %1'lik agaroz jel hazırlanması	19
3.2.5.3 Genomik DNA'nın elektroforez analizi	19
3.3 DNA'nın Seyreltilmesi	19
3.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	20
3.4.1 DNA örneklerinin seyreltilmesi	20
3.4.2 dNTP mix hazırlanması	20
3.4.3 Primerlerin hazırlanması ve seyreltilmesi	20
3.4.4 PCR koşulları	21

3.5 PCR Ürünlerinin Analizi	22
3.5.1 Kapiler elektroforez cihazı çalışma protokolü.....	22
BÖLÜM IV BULGULAR VE TARTIŞMA	25
4.1 Kullanılacak Analiz Yönteminin Belirlenmesi.....	25
4.2 Markör Kontrol Amaçlı Yapılan Çalışma Analizlerinin Değerlendirilmesi	32
BÖLÜM V SONUÇLAR.....	60
KAYNAKLAR	62
EKLER.....	71
ÖZ GEÇMİŞ	115



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan bazı patates ıslah hatları ve ebeveynler.....	13
Çizelge 3.2. Kullanılan markörlere ait primer bilgileri	15
Çizelge 3.3. CTAB ekstraksiyon tamponu içeriği	17
Çizelge 3.4. STM0003 PCR koşulları	21
Çizelge 3.5. RYSC3 PCR koşulları	22
Çizelge 4.1. Ön çalışma analiz sonuçları.....	31
Çizelge 4.2. Dayanıklı ve hassas çeşitlerle yapılan çalışmanın elektroforez jel ve Qiaxcel Advanced cihazı analiz sonuçları.....	47
Çizelge 4.3. Islah hatlarının STM0003 ve RYSC3 primerleri ile PCR ürünlerinin Kapiler elektroforez cihazında analiz sonuçları	48
Çizelge 4.4. Sonuçlara göre dayanıklılık geni içeren ıslah hatları.....	54
Çizelge 4.5. Sonuçlara göre hasas olarak belirlenen ıslah hatları.....	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Ön çalışma elektroforez jel görüntüsü.....	26
Şekil 4.2. 06-62 çeşidinin STM0003 ve RYSC3 primerleri ile PCR ürünlerinin Kapiler elektroforez cihazında analiz sonuçlarının görüntüleri.....	27
Şekil 4.3. Alegria çeşidinin STM0003 ve RYSC3 primerleri ile PCR ürünlerinin Kapiler elektroforez cihazında analiz sonuçlarının görüntüleri.....	28
Şekil 4.4. Demon çeşidinin STM0003 ve RYSC3 primerleri ile PCR ürünlerinin Kapiler elektroforez cihazında analiz sonuçlarının görüntüleri.....	29
Şekil 4.5. Hermes çeşidinin STM0003 ve RYSC3 primerleri ile PCR ürünlerinin Kapiler elektroforez cihazında analiz sonuçlarının görüntüleri.....	30
Şekil 4.6. CIP-43 çeşidinin STM0003 ve RYSC3 primerleri ile PCR ürünlerinin Kapiler elektroforez cihazında analiz sonuçlarının görüntüleri.....	31
Şekil 4.7. Dayanıklı ve hassas çeşitlerle markör kontrol amaçlı yapılan PCR ürünleri elektroforez jel görüntüleri.....	34
Şekil 4.8. Dayanıklı ve hassas çeşitlerle markör kontrol amaçlı yapılan PCR ürünleri Qiagen Qiaxcel Advanced cihazında analiz görüntüleri	46

SİMGE VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
Bp	Base pair
°C	Santigrad derece
g	Gram
ml	Mililitre
μl	Mikrolitre
%	Yüzde
pH	Alkalilik ve asitlik faktörü

Kısaltmalar	Açıklama
DNA	Deoksiribonükleik asit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PVP	Polivinilpirolidon
BSA	Bovine serum albumin

BÖLÜM I

GİRİŞ

Patates (*Solanum tuberosum* L.), Solanaceae familyası içerisinde yer almaktadır (Esendal, 1990). *S. tuberosum* tetraploid yapıda olup; *tuberosum* ve *andigena* olmak üzere iki alt türe ayrılmaktadır. *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* alttürü, dünyanın genelinde yaygın olarak yetiştirilen patatesin bulunduğu gruptur (Hawkes, 1990; OECD, 1997)

Patatesin anavatanı Peru ve Bolivya'nın And Dağlarının yüksek yayla ve serin iklim yerlerinin olduğu kabul edilmiştir. XVI. Yüzyılın ikinci yarısında İspanyollar tarafından ülkelere getirilmiş, daha sonra İngiltere, İrlanda ve İskoçya'ya, ardından diğer Avrupa Ülkelerine ve Kuzey Amerika'ya yayılmıştır (Er ve Uranbey, 2009). Patates, Türkiye'ye ilk kez 19. yüzyıl sonlarında Rusya üzerinden Doğu Karadeniz Bölgesi'ne girmiştir ve bunu takiben de batıdan Trakya Bölgesi'ne girdiği belirtilmiştir (İlisulu, 1957).

Türkiye'de toplam patates üretim alanı 135.937 ha, patates üretimi ise 4.550.000 ton olarak kaydedilmiştir. Niğde ili ise 20.299 ha yetiştirme alanına ve 732.188 ton üretime sahiptir.

Patates yumrularının % 15-35 kuru madde, % 2 protein, B1, B2, B6 ve C vitaminleri ile bazı besin elementlerini içinde bulundurması sebebiyle insanlar tarafından gıda olarak, ayrıca endüstride nişasta, alkol ve ispiroto yapımı için hammadde olarak kullanılmaktadır (Esendal, 1990). Patatesin, Dünya'da bitkisel gıda kaynağı olarak buğday, çeltik ve mısırdan sonra 4. sırada yer aldığı bilinmektedir. Ucuz olması, birim alanda fazla verimin alınması, besin değerinin yüksek, sindiriminin kolay, kullanım alanının geniş olması nedeniyle, hemen hemen bütün dünya ülkeleri tarafından üretilmekte ve tüketilmektedir (Akınerdem ve Öztürk, 2005; Elçi, 1994; Er ve Uranbey, 2009). Ayrıca düşük oranda protein ve yüksek oranda nişasta içeren patates birim alanda yüksek kuru madde üretimi sağlanması yanında, kuru maddeyi oluşturan bileşiklerin dengeli dağılımı, kullanım ve etkinlik değerinin yüksek olması gibi özellikleriyle de önemlidir ve binlerce yıldır insanlık için sağlıklı bir beslenme kaynağı olmuştur (Güner ve Yorgancı, 2009).

Patates tarımında en önemli faktörlerden birisi kaliteli tohumluk kullanımıdır. Patates, yumru ile çoğaltılan bir bitki olması nedeniyle tohumluk üretim aşamasında dikkat edilmesi gerekmektedir. Dikkat edilmediği koşullarda, başta virüs olmak üzere, birçok hastalık etmeni kolaylıkla yumruya bulaşmakta ve tohumun dejenere olmasına neden olmaktadır (Arıoğlu vd., 2006). Türkiye’de patates bitkisinden birim alandan elde edilen verimin artmamasının nedenlerinden birisi yeterli ölçüde kaliteli tohumluk kullanılmamasıdır. Tohumluğun kalitesi fizyolojik yaşına, yumru iriliğine, fungus, bakteri, virüs gibi hastalık etmenleriyle bulaşık olup olmaması gibi özelliklere bağlıdır (Avila vd., 1989; Spiegel ve Martin, 1993). Singh ve Singh (1996), farklı patates çeşitlerinin sürgün, göz ve yumrularında PVY⁰’ın yoğunlukları arasında farkın bulunup bulunmadığını belirlemek için yaptıkları çalışmada çeşitlere ait yumrulara virüs yoğunlukları arasında 128 kat farklılığın olduğunu belirlemişlerdir.

Patates bitkisindeki enfeksiyona neden olan virüsler tohumluk yumrular ile yıldan yıla taşınabildiği gibi, yıl içerisinde de mekaniksel olarak ya da vektörlerle taşınarak hızlı bir şekilde yayılmaktadır (Bostan vd., 2004; Jones, 1988). Bu durum tohumluğun çok kısa sürede yozlaşmasına neden olmaktadır. Genelde üç yıldan sonra aynı tohumluğun kullanılması enfeksiyon oranının artmasına bağlı olarak verimde önemli kayıplara neden olmaktadır (Slack, 1995; Spiegel ve Martin, 1993). Ayrıca virüsler bitkilerdeki metabolizma faaliyetleri ile çok sıkı bir ilişki içerisinde olduğu için virüs hastalıkları doğrudan kimyasal mücadele ile kontrol edilememektedir (Walkey, 1991). Bu durumda virüs hastalıklarının neden olduğu verim kayıplarının önlenmesi için virüslerden arı tohumluk kullanımı büyük önem taşımaktadır (Jones, 1988; Spiegel ve Martin, 1993).

Yapılan birçok çalışmada 25’den fazla virüsün ve bir viroid’ in doğal olarak patatesi enfekte ettiği saptanmıştır (Salazar, 1996). Patates tarımında sorun yaratan en yaygın virüsler, Patates X virüsü (PVX), patates yaprak kıvrılma virüsü (PLRV), patates S virüsü (PVS) ve patates Y virüsü (PVY) olup, bu virüslerin dünya genelinde patatesteki şiddetli enfeksiyonlara ve önemli verim kayıplarına neden oldukları saptanmıştır (Brunt, 2001; Hooker, 1986; McDonald, 1984; Salazar, 1996; Shukla vd., 2001).

Virüs hastalıkları sistemik enfeksiyona neden olmakta ve patatesteki kalite ve verimi düşürmektedir (Gray vd., 2010). Hastalık etmenlerine karşı alınan kültürel önlemler kesin çözüm olmamaktadır. Patates hastalık etmenlerinden önemli ölçüde etkilendiği

gibi bitkiler; virüs, bakteri, fungus, nematod ve böcekler tarafından saldırıya uğramaktadırlar. Bitkiler bu etmenlere karşı kendilerini koruyacak bağışıklık sistemlerine sahip değildirler. Bu nedenle kendilerini korumak için ya devamlı ya da teşviklenme durumunda faaliyete geçen antimikrobial savunma mekanizmaları ve dayanıklılık genleri (R) taşımaktadırlar. Bunun için üzerinde çalışılan hastalık veya zararlı etmene karşı dayanıklılığı sağlayan gen veya genleri belirlemek ve belirlenen bu genleri ıslah programında kullanarak dayanıklı bireyler elde etmek gerekmektedir (Devran, 2016).

Patateste dayanıklılık genleri bakımından, çoğunlukla dominant veya resesif genlerden söz edilirken (Gebhardt vd., 2006), diğer bazı özellikler için majör genler veya kantitatif özellik lokusları (QTL)'nın dayanıklılık ya da tolerans sağladığı ifade edilmektedir (Gebhardt vd., 2006; Gebhardt ve Valkonen, 2001). Son yıllarda patates ıslah programlarında hastalıklara ve zararlılara dayanıklı yeni çeşitlerin geliştirilmesinde ilgili genlere bağlı moleküler markörler geliştirilmiş ve seleksiyonda başarıyla kullanılmaktadır (Bakker vd., 2011; Caromel vd., 2005; Flis vd., 2005; Gebhardt vd., 2006; Gebhardt ve Valkonen, 2001; Simko vd., 2007). Markör destekli seleksiyon (MAS) uygulanarak ıslah çalışmaları daha kısa sürede ve daha az işgücü ile tamamlanabilmekte ayrıca ihtiyaç duyulan populasyon büyüklüğü de klasik ıslaha göre çok daha küçük olmaktadır (Gupta ve Rustgi, 2004).

PVY'ye dayanıklı çeşitler geliştirmek için çalışmalar yapılmış ve yapılan bu çalışmalarda PVY'ye dayanıklılık genleri sürekli olarak araştırılmıştır. Araştırmalar sonucunda PVY'ye karşı direnç gösteren genler olduğu tespit edilmiştir. PVY'ye dayanıklı veya toleranslı çeşitler geliştirmek için dayanıklılık genlerinin bulunması ve haritalanması gerekmektedir. Bitkiler virüslere karşı kendilerini koruyacak bağışıklık sistemlerine sahip olmadıkları için ya devamlı ya da teşviklenme yoluyla faaliyete geçen antimikrobial savunma mekanizmaları ve dayanıklılık genleri taşımaktadırlar. Dayanıklılık genleri, patojene karşı dayanıklılığı kontrol eden en önemli yapısal proteinleri kodlamaktadırlar ve bu dayanıklılık genlerinin belirlenmesi moleküler markörler kullanılarak elde edilebilmektedir. Arzulanan karakterlere bağlı moleküler markör kullanılarak ilgili hatların seçilmesi ile moleküler markör yardımcı seleksiyon yapılmaktadır. Bu çalışmayı geleneksel yöntemlere göre yapmak, fazla zaman, yer, materyal, iş gücü gerektirmekte, aynı zamanda birden fazla hastalık ve zararlı etmeninin

test edilmesi mümkün olmamaktadır. Bu gibi zorluklar ilgili karaktere bağı moleküler işaretleyicilerin geliştirilmesi ile aşmakta, zaman ve işgücü tasarrufu sağlanmaktadır (Devran, 2016). Bu genlerinin belirlenmesi, geleneksel yöntemlere göre daha uzun zaman almaktadır ve gözlemlemek zordur. Bu durumda moleküler markörler kullanılarak bu zorluklar ortadan kaldırılabilir (Vardar-Kanlıtepe vd., 2010).

Patateste PVY'ye karşı dayanıklılık, dominant tek gen tarafından kontrol edilmekte ve ırk spesifik olmayan (non-spesifik) dayanıklılık göstermektedir (Mori vd., 2012; Simko vd., 2007). *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* türünde Ry_{adg} , *S. stoloniferum*'da Ry_{sto} ve Ry_{fsto} , *S. chacoense*'de ise Ry_{chc} genlerinin PVY'yi kontrol eden genler olduğu belirlenmiştir (Flis vd., 2005; Kasai vd., 2000; Mori vd., 2012; Takeuchi, 2008; Witek vd., 2006). Ry_{adg} geni XI. kromozomda (Kasai vd., 2000), Ry_{chc} geni IX. (Takeuchi, 2008) ve Ry_{sto} ve Ry_{fsto} genleri ise XII. kromozomda haritalanmıştır (Flis vd., 2005; Song vd., 2005; Witek vd., 2006). PVY'ye dayanıklılık genleri ile bağlantılı olan moleküler markörler patateste seleksiyon ıslahında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Gebhardt vd., 2006).

Özetle, patates ıslah programı uygulanırken moleküler markörlerden yararlanılarak PVY'ye dayanıklılık genleri tespit edilebilmekte ve bu genlerin kullanılmasıyla bu hastalığa dayanıklı yeni çeşitler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu tezin amacı da, moleküler markörler kullanılarak PVY'ye karşı dayanıklılık genlerini içeren ıslah hatlarının tespit edilmesidir. Yapılan çalışmalarla incelenen popülasyonlardaki bireyler PVY'ye dayanıklı ve hassas olarak değerlendirilmiştir. Böylece, bir ıslah programında moleküler yardımcı seleksiyon yaklaşımıyla PVY'ye dayanıklı yeni patates çeşit adayları belirlenmiştir. Bununla birlikte, tez kapsamında kullanılan moleküler markörlerin Türkiye'de yürütülen patates ıslah programlarında kullanılabileceği belirlenmiştir.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

2.1 Patates Y Virüsü (PVY)

Patates Y virüsü, Potyviridae familyasına ve Potyvirus grubuna ait tek sarmal RNA içeren bir virüstür, ilk olarak 1930'lu yıllarda tespit edilmiştir (Arnedo-Andrés vd., 2006). PVY, Solanaceae, Chenopodiaceae, Amaranthaceae, Compositae, Leguminosae başta olmak üzere, genel olarak 27 familyada, 69 cinsin 342 türünden fazlasını hastalandırabilmektedir (Boonham ve Barker, 1998). *Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*, *Chenopodium quinoa*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotina tabacum*, *Solanum tuberosum*, *Tinantia erecta* gibi türler PVY'nin hassas konukçu türlerine örnek teşkil etmektedirler. Doğada ki hastalık vektörü ise Aphid (yaprak biti)'dir. PVY, bütün dünyada 73 farklı aphid türü ile yayılım göstermektedir (Varveri, 2000). En önemli vektörlerinin *Myzus persicae*, *Aphis nasturtii*, *Myzus certus*, *Aphis fabae*, *Rhopalosiphum insertum* ve *Macrosiphum euphorbiae* olduğu bilinirken, bu vektörler ile kalıcı olmayan (non-persistent) şekilde taşınmaktadır (Varveri, 2000).

Bitki virüslerinin şekil ve yapıları değişiklik gösterebilmektedir, PVY ise ipliksi yapıya sahip, %5,4–6,4 nükleik asit ve %93,6–94,6 protein içeren, genomu tek parçalı ve 10,4 kb uzunluğunda olup, virüsü ise 740 nm uzunluğunda ve 11 nm genişliğindedir (Boonham ve Barker, 1998). PVY genomu yaklaşık olarak 9700 bazlık RNA içermekte ve bu RNA'nın 3' ucundaki kılıf proteini kodlayan bölgenin aminoasit ya da nükleotid sekansını ve 3' çevrilmeyen bölgenin nükleotid sekansını bulunduran baz dizisi, türlerin ayırımında kullanılmaktadır. Genomun 5' ucundaki sekans ise daha büyüktür ve bu sekans ise ırkların (suş) ayırımında kullanılmaktadır (Spetz vd., 2003).

PVY genellikle uzun süre canlılığını yitirmeyen stabilitesi yüksek bir virüstür ve hastalığın yayılmasının en önemli etmeni yaprak bitleridir. Yapılan araştırmalara göre en az 30 tane yaprak biti vektörü bulunup, bunlardan en önemlisi Patates yaprak biti (*Aphis nasturtii*)'dir. Patates Y virüsünü dünyaya bu vektör yaymıştır. Ayrıca hastalıkta yayılma yollarından biride bulaşık tohumluk kullanımıdır. Patates üretiminin yoğun olarak yapıldığı Niğde, İzmir, Nevşehir, Bolu ve Erzurum'da yapılan bir çalışma

sonucunda tohumluk olarak kullanılan patates yumrularında % 16,8 PVY bulaşıklığı gözlemlenmiştir (Bostan ve Haliloglu, 2004).

PVY, başka patates virüsleriyle birlikte enfeksiyon olduğunda daha da büyük zarar oluşturmaktadır. Sertifikasyon programları sırasında tohumların reddedilme nedenlerinden biri olarak PVY ilk sıralarda yer almaktadır (Ragsdale vd., 2001). Patates Y virüsü dünya çapında yayılan, ürün kalite ve verimini %80'e kadar azaltan önemli bir bitki patojeni olarak bilinmektedir (Hämäläinen vd., 1997).

Arazi içerisinde enfeksiyon kaynağı bulunduğu müddetçe bu virüslerin bazıları mekaniksel olarak, bazıları da vektörlerle ya da her iki şekilde de taşınabilmektedir. Buna bağlı olarak da kısa zaman içerisinde patates bitkisi bu virüslerin bir kaçının enfeksiyonuna aynı anda maruz kalmaktadır (McDonald, 1984; Singh, 1999). Bu virüsler içerisinde patateste en yaygın ve zararlı virüslerden bir tanesi patates Y virüsüdür. PVY'nin belirtileri virüsün ırkına, çeşitlerin hassasiyetine, enfeksiyon zamanında bitkilerin yaşına ve çevre koşullarına bağlı olarak değişmektedir. Diğer virüs hastalıklarında olduğu gibi PVY için de alınabilecek kültürel önlemler vardır fakat bu önlemler kesin bir çözüm yolu içermemektedir ve kimyasal mücadele çözüm olmamaktadır. PVY etmeni tohumla taşınmazken bulaşık tohumluk yumrularla, temasla ve yaprak bitleriyle taşınmaktadır. Bu virüsün etmeni % 90'lara varan ürün kayıplarına neden olmaktadır (Flis vd., 2005; Sagredo vd., 2009). Bu virüsün, Amarantaceae, Chenopodiaceae, Compositae ve Leguminosae familyalarından çok sayıda bitki türü ile Solanaceae familyasında da patates, biber, domates ve tütün bitkilerini enfekte ettiği bilinmektedir (McDonald ve Singh, 1996; Ward ve Shukla, 1991).

Bazı ırklar ise patateste % 10-100 verim kaybına neden olabilmektedir (De Bokx ve Huttinga, 1981). Ayrıca bu virüs tohumluk yumrulara diğer virüslere göre daha yüksek oranda tespit edilmektedir (Güner ve Yorgancı, 2009). PVY faktörü ile mücadele doğrudan ve dolaylı yollarla yapılabilir. Enfekteli bitkilerin sökülerek yok edilmesi yöntemi ile virüs direkt olarak elemine edilebilir (Ottoman vd., 2009). Ayrıca sağlıklı tohumluk patates yumruları kullanılarak PVY enfeksiyonu azaltılabilmektedir.

Virüs tarafından oluşturulan hastalık ise 'Patates Damar Bantlaşması Mozaik' ve 'Şiddetli Mozaik' hastalığı olarak bilinmekte ve virüsün doğada üç ırkı bulunmaktadır.

Patates Y^O virüsü (PVY^O), ortak ırk olarak bilinmekte ve patatesin yetiştirildiği her yerde görülebilmektedir. İlk kez Smith (1931) tarafından tanımlandığı bilinmektedir. Mozaik, yaprak dökümü, yaprak ve gövde nekrozu, tütün bitkilerinde ise hafif mozaikler şeklinde semptom göstermektedir. Patates Y^N virüsü (PVY^N), nekrotik ırk olarak bilinmekle birlikte ilk kez 1950'lerde tespit edilmiştir. Bu ırk, patates bitkilerinde hafif mozaik oluşmasına ya da hiç bir semptomu sebep olmamaktadır (Singh ve Somerville, 1992). PVY^N dünya çapında yayılmış ve ilk kez 1990 yılında Kuzey Amerika'da tespit edilmiştir. Çizgi grubu olarak bilinen patates Y^C virüsü (PVY^C) ise, ilk olarak 1984 yılında tespit edilmiştir (Beczner vd., 1984).

PVY'nin replikasyonu sırasında, virüs mekaniksel olarak ya da vektörler yoluyla yaralandırılmış hücre duvarını geçip, doğrudan penetrasyon yolu ile tam olarak sitoplazmaya geçmektedir (Whitham ve Wang, 2004). Kapsid enzimler tarafından parçalanıp daha sonra viral ürün hücre sitoplazmasında sentezlenmeye başlanmaktadır. Pozitif polariteli ve tek iplikli PVY, parental RNA'yı mRNA olarak kullanmaktadır. Daha sonra pozitif iplikçigi doğrudan proteine çevrilmektedir. Çevrilen proteinin oldukça büyük olması sebebiyle fonksiyonel olması için proteazlarca parçalanması gerekmektedir. Sentez edilen proteinlerden biri olan RNA polimeraz, pozitif RNA'yı kalıp olarak kullanıp komplementer negatif RNA'yı sentez etmekte ve böylece çift iplikli RNA oluşturmaktadır. Yeni pozitif iplikçiklerin sentez edilmesi için negatif iplikçik kalıp olarak kullanılmaktadır ve bütün partikülün birleşmesi ise sitoplazmada gerçekleşmektedir. Öncelikle boş kapsid oluşmaktadır. Daha sonra ise viral nükleik asit kapsid içinde paketlenmektedir. Olgunlaşan virüsün salınması ise hücrenin otolizisi ile sağlanmaktadır (Agrios, 1997).

2.2 PVY Semptomları

Patateslerde önemli virüs hastalıklarında Patates Y Virüsü patateslerde önemli ürün kaybına sebep olan virüslerdendir. İpliksi helix yapısında partikülleri olan Potyvirus grubuna dahil PVY yaprak bitleri ile non persistent olarak taşınmaktadır. En önemli vektörü ise *Myzus persicae*'dir. Ayrıca *Aphis nasturtii*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Myzus certus* gibi vektörler yoluyla da taşınabilmektedir. Patates çeşidi ile virüs ırkı arasındaki ilişkilere bağlı olarak semptomlar değişmekle birlikte yapraklarda lekelenme ve kıvrıcılık en yaygın görülen belirtilerdir (Brunt vd., 1990; Stevenson vd., 2001).

Patates bitkisinde PVY belirtilerinin ırka ve çeşitlere göre değiştiği, genelde bitkilerin yapraklarında mozaik, sararma ve bunların yanında yaprakların alt yüzeyindeki damarlarda nekrotik siyah çizgilere, sürgünlerin alt yapraklarında kurumalara ve çoğu zamanda bitkilerin ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir (Bostan ve Demirci, 2011; Delgado-Sanchez ve Grogan, 1970; Hooker, 1986).

PVY'nin birçok ırkı domates, biber ve tütünde hafif beneklenmelere oluşturmaktadır. PVY enfeksiyonu tütün bitkisinin verimini %30'a kadar düşürmektedir. Tütün damar nekrozu hastalığına sebep olan PVY^N suşu, üründe tamamen kayba neden olmaktadır. Biber ve domatestede de önemli hasar ve kayıplara sebep olmakta, patates yumrusunda ise halkasal nekrotik lekeler oluşturmaktadır (Mehle vd., 2004). PVY özellikle patates alanlarında % 100 ürün kayıplarına neden olabilmektedir (Warren vd., 2005).

Patates Y Virüsünün Y^N, Y^O ve Y^C olmak üzere farklı ırkları bulunmaktadır. PVY^N yapraklarda klorotik veya nekrotik halkalara ve lekeler, damarlar arasında açık yeşil renkte beneklenmelere ve yapraklarda küçülmelere sebep olurken PVY^O, tepe yapraklarda kurumalara, yaprak dökülmelerine veya bu yaprakların bitki üzerinde asılı kalmasına neden olmaktadır. Ayrıca bitkilerde nekroz görüntüleri ile beraber kıvrıcılık, bitkide cüceleşme şeklinde semptomlar görülmektedir. PVY^C ise yapraklarda nekrotik halkalara veya beneklere ve mozaik semptomlara sebep olurken damarlar boyu bantlaşma ve damarlarda incelme, gövde ve yaprak sapında mozaik ve nekrozlar şeklinde görülmektedir. Bunlar dışında ise yumrulara gözler çevresinde nekrozlara hatta bitki ölümlerine sebep olmaktadır (Brunt vd., 1990; Stevenson vd., 2001).

PVY^O ve PVY^C'nin belirtileri PVY^N'e göre daha şiddetli olmaktadır, yaprak beneklenmesi, sararması, yaprak deformasyonu, nekrotik yaprak lekeleri ve halkaları, damarlarda nekroz, yaprak dökülmesi ve gövdenin vaktinden önce ölümü şeklinde görülmektedir. Bu ırk ile enfekteli bitkilerin tepe kısmında çalimsı büyüme ve gövdenin alt tarafında daha az yaprak görülmektedir. PVY^N de daha hafif yaprak beneklenmesi oluşmaktadır. PVY^O ve PVY^C ve PVY^N ile bulaşık bitkilerin yumruları normal görülmektedir. PVY'nin belirtileri patates çeşidine, virüs strainin virülensine bağlı olarak farklılık göstermektedir (Jones vd., 2003).

2.3 Moleküler Markörler

Moleküler markörler, bir popülasyonun genetik materyalini oluşturan DNA'larının baz dizilimindeki farklılıkları değişik yollarla ortaya çıkaran markörlerdir. Morfolojik ve biyokimyasal markörlerden daha üstün ve daha çabuk sonuç alınabilinen ve zaman sınırlaması olmayan çalışmalar yapılmaya moleküler markörlerin geliştirilmesiyle başlanmıştır (Yıldırım ve Kandemir, 2001). Moleküler markörlerin bitki ıslahı ile bütünleştirilmesi sonucunda birçok yenilik meydana gelmiştir (Agarwal vd., 2008). Genel olarak moleküler markörler, kalitatif ve kantitatif özelliklerin ıslahında, seleksiyonda, genetik ve linkage haritalamalarında, çeşit tanımlaması ve korunmasında, genotipler arası genetik uzaklığın belirlenmesinde yarar sağlamaktadır (Bilgin ve Korkut, 2005).

Patates ıslahında genellikle verimli, kaliteli, adaptasyon yeteneği yüksek, hastalık ve zararlılara dayanıklı, stres faktörlerine toleranslı çeşit geliştirmek amaçlanmaktadır. Bu amaçlar doğrultusunda yürütülen klasik ıslahta; yabancı veya kültür formunda bulunan dayanıklılık genleri ve ilgili diğer genler istenilen çeşitlere tekrarlanan geri melezlemeler ile aktarılmaktadır. Ayrıca her generasyonda fenotipik seleksiyon yapılmaktadır. Bütün bu işlemlere bağlı olarak ıslah süresi uzun olmakta ve çok sayıda melezlemeden yüksek bir oranda seleksiyon yapmak gerekmektedir (Gebhardt vd., 2006).

Patates bitkisi tetraploid genetik yapıdadır ve kendileme depresyonu nedeniyle yüksek derecede heterozigotluk göstermektedir. Ayrıca ıslahçılar için önemli olan birçok özellik çok gen tarafından idare edilmektedir ve bütün bunlar patates ıslahında dezavantaj olarak görünmektedir (Bradshaw vd., 1998). Patates ıslahçılarının çeşit seçmek ve geliştirmek için 11-12 yıl gibi çok uzun bir süre içerisinde yaklaşık 100 bin hatta en az 50 farklı özelliği incelemeleri gerekmektedir.

Hastalık ve zararlı etmeninin çoğalma ve gelişmesinin bitki tarafından engellenmesi dayanıklılık ile ifade edilmektedir. Bitki düşük, orta ve yüksek düzeyde dayanıklılık gerçekleştirmektedir. Bu dayanıklılık yüksek düzeyde ise patojen hiç çoğalamamakta yada çok az oranda çoğalabilmektedir. Orta ve düşük dayanıklılıkta olan bitkilerde ise belli

düzeyde çoğalabilmektedir. Dayanıklılık kalıtsal olarak; tek gen (monogenic), birkaç gen (oligogenic) ve çok gen (polygenic) tarafından idare edilmektedir.

Geleneksel ıslah yöntemleri ile başta çok gen olmak üzere, birkaç gen ve tek gen tarafından idare edilen dayanıklılık özelliklerini normal olarak belirlemek için zamana ihtiyaç duyulmaktadır ayrıca fazla iş gücü gerektirmekte ve çok zor olmaktadır. Bir bitkiyi aynı zamanda birden fazla hastalık veya zararlı etmenle test etmek klasik yöntemlerle neredeyse imkansızdır. Moleküler markörlerin kullanılması bu zorlukların aşılmasına olanak sağlamaktadır (Ballvora vd., 1995; Bradshaw vd., 1998; Lu vd., 1999).

Bitkilerde kullanılan moleküler markörler iki gruba ayrılmaktadır. Bu gruplar polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı olmayanlar (RFLP) ve olanlar (RAPD, AFLP, SSR vb.) olarak nasıl üretildiklerine göre belirlenirler (Ridout vd., 1999; Staub vd., 1996). Ayrıca moleküler markörler dominant markörler ve kodominant markörler olmak üzere iki farklı şekilde daha gruplandırılmaktadır (Devran, 2016). Bu sınıflandırma markörün homozigot ve heterozigot bireyleri ayırt edebilme özelliğine göre yapılmakta olup, homozigot veya heterozigot bireyleri ayırt edebilen markörler kodominat, ayırt edemeyenler ise dominant markör olarak adlandırılmaktadır.

Bitki hastalık direnci genlerinin ortak bir özelliğini temel alan PVY direnç geni Ry_{adg} için SCAR markörlerinin geliştirilmesi üzerine yapılan bir araştırmada, patates Y potivirüsüne (PVY) aşırı direnç sağlayan Ry_{adg} genini taşıyan bir patates bitkisinden izole edilmiş direnç genine benzer fragmanlar içindeki nükleotit farklılıklarına dayanarak sekans-özellikli çoğaltılmış bölgeler (SCAR) geliştirilmiştir. SCAR'lar, 103 patates üretim hattı ve Avrupa, Kuzey Amerika ve Japonya'dan türetilen farklı genetik kökenli bitki çeşitleri ile test edilmiştir. İki markör, Ry_{adg} geninin tespiti için yüksek hassasiyet göstermiştir. SCAR markör RYSC3 sadece Ry_{adg} taşıyan genotiplerde üretilmiştir. SCAR markör RYSC4, Ry_{adg} taşıyan tüm genotiplerde ve ayrıca dört PVY'ye duyarlı genotipte tespit edilmiştir. Her iki markör de, *S. tuberosum* subsp. *andigena*'dan farklı türlerden meydana gelen diğer Ry genlerini taşıyan genotiplerde tespit edilmemiştir. Bu nedenle, patates yetiştirme programlarında Ry_{adg} geni bakımından yapılacak markör destekli seleksiyonda RYSC3 ve RYSC4 markörlerinin güçlü bir araç olabileceği değerlendirilmiştir (Kasai vd., 2000).

Markör destekli seleksiyon, özellikle monojenik kalıtsal özellikler söz konusu olduğunda, patates yetiştiriciliğine aşamalı olarak dahil edilmektedir. Yapılan altı çaprazlamada, Alman, Macar, Polonya, Hollanda ve Slovak yetiştirme programlarından Patates virüsü Y (PVY) 'ye aşırı direnç gösteren çeşitler ve klonlar, dişi ebeveyn olarak kullanılmıştır. F1 ürünlerinin çeşitlerinin, klonlarının ve fidelerinin değerlendirilmesi için, Ry_{sto} ve Ry_{adg} viral direnç alellerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bazlı markörleri kullanılmıştır. Tüm dirençli F1 genotipleri, Ry_{sto} alleli ile ilişkili üç moleküler markör (STM0003, GP122718 ve GP122406) kullanılarak güvenilir bir şekilde tanımlanmıştır. Fenotipik veriler ve Ry_{adg} markörleri ile hiçbir genotip uyum sağlamamıştır. Ry_{adg} ve seçilen üç Ry_{sto} markörü, bir in vitro gen bankasından 40 genotipe uygulanmış ve 14 genotipin, Ry_{sto}'ya sahip olduğu ve hiçbirinin Ry_{adg}'ye sahip olmadığı kabul edilmiştir (Heldák vd., 2007).

Ottoman vd. (2009), yaptıkları bir araştırmada *S. tuberosum* ssp. *andigena*'nın, PVY'ye aşırı direnç sağladığı ve bu genin genetik olarak XI kromozomu ile eşleştirilip bağlantılı PCR bazlı DNA markörleri ile tanımlandığını belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışmada bir tetraploid patates yetiştirme programında PVY direncinin seçilmesinde bir araç olarak Ry_{adg} ile bağlantılı moleküler markörlerin kullanılabilirliğini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Bu amaçla, Ry_{adg} için ayrılan bir tetraploid popülasyon Ry_{adg}'ye bağlı, PVY⁰ ile yapay olarak aşılanmış, bitkileri ELISA ve moleküler markörlerle taramışlardır. Ayırıştırma çizgilerinin büyük bir yüzdesinde (% 96.4), aşılamadan 40 gün sonra moleküler markörler ve ELISA sonuçlarının arasında uyuma görüldüğünü, ELISA tarafından takip edilen yapay aşılama alternatif olarak moleküler markörlerin kullanımının doğru olduğunu gösterdiğini belirtmişlerdir.

Virüsler patates yetiştiriciliğinde en büyük sorunlardan biridir. Dayanıklılık ıslahı, patatesten virüsleri kontrol etmenin tek etkili yöntemidir. Bununla birlikte, geleneksel üretim yöntemleri, patateslerin tetraploid ve heterozigot olmasından dolayı yavaş ve zahmetlidir. Yabani *Solanum* türlerinden türetilmiş genlere, moleküler markörler tanımlanmış ve eşlenmiştir. Markörlerin mevcut olduğu virüslere aşırı direnç veya aşırı duyarlılık gösteren genler ve patates başarıyla girmiştir. Virüs direnç genleri için Ry_{adg}, Ry_{sto} gibi kolay tahlil markörlerinin bazıları patates yetiştiriciliğinde markör destekli seleksiyon (MAS) için geliştirilmiştir. ISSR, CAPS, RAPD, SCAR ve STS gibi Agaroz

bazlı tanısal PCR markörleri, MAS yoluyla virüs direnci için daha hızlı ve doğru patates yetiştirme potansiyeline sahiptir (Tiwari vd., 2012).

Yabani patates türü olan *Solanum stoloniferum*'dan meydana gelen ve PVY'ye karşı aşırı direnç gösteren R_{ysto} genine bağlı moleküler markörler tanımlanmış ve yakın zamanda yayınlanan Rysto markörlerin uygulanabilirliği analiz edilmiştir. Toplam 8.60 cM'lik bir mesafeyi kapsayan üç RAPD markörü tespit edilmiştir. Bu markörlere en yakın olanı, genden 0.53 cM uzaklıkta konumlandırılmıştır. Yayınlanmış markörlerden yalnızca bir tanesi deneysel bitki materyalinde tanı değerine sahiptir ve yapılan çalışmada geliştirilen RAPD markörlerinin karşı tarafında, genden 2.95 cM ötede saptanmıştır. Analiz edilen tüm markörler *Solanum stoloniferum* girişlerinde mevcuttur, dirençlerinden bağımsız olarak, bu sekansların lokus ile bağlantılı olduğunu ve sadece yabani türlerdeki R_{ysto} geninin baskın alleleline bağlı olmadığını göstermiştir (Cernák vd., 2008).

BÖLÜM III

MATERYAL VE METOT

3.1 Bitki Materyali ve Kullanılacak Markörler

Tez kapsamında, Doğa Tohumculukta geliştirilen 435 ıslah hattı PVY'ye dayanıklılık bakımından taranmıştır. Tez çalışmasında kullanılan ıslah hatlarının ebeveyn listesi Çizelge 3.1'de verilmiştir. Bu ıslah hatlarının bazılarında ise rastlantısal olarak tekerrürlü yaprak örneği alınmıştır. Rastlantısal olarak örnek alınan bu 6 ıslah hattının 5 tanesinden iki tekerrürlü 1 tanesinden ise üç tekerrürlü örnekler alınmıştır. Ayrıca daha önceki çalışmalara (www.europotato.org) göre dayanıklı ve hassas olduğu bilinen 18 genotip kullanılmıştır. Yaptığımız çalışmada, Y virüsüne dayanıklılığın taranması için RYSC3 ve STM0003 isimli iki seleksiyon markörü kullanılmıştır. Bu markörlere ilişkin bilgiler Çizelge 3.2'de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan bazı patates ıslah hatları ve ebeveynler

	Islah Hatları	Ebeveynler
1	DT11007	Allegria x Challenger
2	DT11009	Allegria x (Marfona x Challenger)
2	DT11010	Allegria x Lady Olympia
2	DT11017	Borwina x Lady Olympia
5	DT11024	Birte x Granola
6	DT11032	Fasan x Tucan
7	DT11036	Fasan x Gala
8	DT11039	Fasan x Allegria
9	DT11042	Gala x Challenger
10	DT11044	Hermes x Talent
11	DT11049	Horizon x Challenger
12	DT11052	Horizon x Allegria
13	DT11055	Lady Rosetta x Lady Olympia
14	DT11057	Lady Clair x Allegria
15	DT11065	Marfona x Borwina
16	DT11066	Marfona x Challenger
17	DT11068	Marabel x Allegria
18	DT11078	Pomqueen x Tucan
19	DT11079	Pomqueen x Innovator
20	DT11081	Pomqueen x Adora
21	DT11084	Solist x Challenger

Çizelge 3.1. Devam		
22	DT11088	Saturna x Allegria
23	DT11094	Shepody x Allegria
24	DT11098	Talent x Hermes
25	DT11102	Tucan x Saturna
26	DT11103	Tucan x Challenger
27	DT11107	Tucan x Allegria
28	DT11108	Tucan x Banba
29	DT12001	Agria x Challenger
30	DT12004	Agria X Borwina
31	DT12005	Agria x Allegria
32	DT12006	Agria x Tucan
33	DT12007	Allegria x Challenger
34	DT12009	Allegria x (Marfona x Chall.)
35	DT12010	Allegria x Lady olympia
36	DT12011	Allegria x Solist
37	DT12012	Allegria x Tucan
38	DT12013	Allegria x Adora
39	DT12014	Adora x Talent
40	DT12015	Adora x Allegria
41	DT12016	Aagila x Kiebitz
42	DT12017	Borwina x Lady olympia
43	DT12022	Birte x Gorwina
44	DT12024	Birte x Granola
45	DT12027	Challenger x Borwina
46	DT12031	Fasan x V.gogh
47	DT12032	Fasan x Tucan
48	DT12034	Fasan x Hermes
49	DT12035	Fasan x Pomqueen
50	DT12036	Fasan x Gala
51	DT12037	Fasan x Challenger
52	DT12038	Fasan x Talent
53	DT12039	Fasan x Allegria
54	DT12042	Gala x Challenger
55	DT12043	Kiebitz x Challenger
56	DT12045	Hermes x Challenger
57	DT12046	Hermes x Allegria
58	DT12049	Horizon x Challenger
59	DT12052	Horizon x Allegria
60	DT12053	Lady rosetta x Hermes
61	DT12055	Lady rosetta x Lady olympia
62	DT12057	Lady clair x Allegria
63	DT12060	Lady olympia x Pomqueen
64	DT12061	Lady olympia x Challenger
65	DT12062	Lady olympia x Borwina

Çizelge 3.1. Devam		
66	DT12063	Lady olympia x Shepody
67	DT12064	Mor patates x Challenger
68	DT12065	Marfona x Borwina
69	DT12066	Marfona x Challenger
70	DT12067	Marfona x Gala
71	DT12068	Marabel x Allegria
72	DT12069	Marabel x Romanze
73	DT12070	Marabel x Tucan
74	DT12071	Nandu x Hermes
75	DT12072	Nandu x Lady olympia
76	DT12073	Nandu x Challenger
77	DT12077	Pomqueen x Allegria
78	DT12078	Pomqueen x Tucan
79	DT12079	Pomqueen x Innovator
80	DT12082	Pomqueen x Challenger
81	DT12084	Solist x Challenger
82	DT12088	Saturna x Allegria
83	DT12090	Saturna x Lady olympia
84	DT12091	Saturna x Pom quin
85	DT12093	Shepody x Lady olympia
86	DT12094	Shepody x Allegria
87	DT12095	Shepody x Pom quin
88	DT12097	Talent x Challenger
89	DT12098	Talent x Hermes
90	DT12100	Tucan x Adora
91	DT12101	Tucan x İnnavatör
92	DT12102	Tucan x Saturna
93	DT12103	Tucan x Challenger
94	DT12104	Tucan x Horizon
95	DT12106	Tucan x Lady olympia
96	DT12107	Tucan x Allegria
97	DT12109	Orlo x Borwina
98	DT12111	Van gogh x Challenger

Çizelge 3.2. Kullanılan markörlere ait primer bilgileri

Virüs	Gen	Markör	Primer Dizisi (5'-3')	Bağlanma Sıcaklığı (°C)	PCR ürünü uzunluğu (bp)	Kaynak
PVY	<i>Ry_{sto}</i>	STM0003	F: GGAGAATCATAACAACCAG R: AATTGTAACCTGTGTGTGTG	50	140 ve 111	(Song vd., 2005)
PVY	<i>Ry_{adg}</i>	RYSC3	F: ATACACTCATCTAAATTTGATGG R: AGGATA ACGGCATCATTTTCCGA	60	321	(Kasai vd., 2000)

3.2 Yaprak Örneklerinin Toplanması ve DNA İzolasyonu

Geliştirilen melez patates ıslah hatlarının PVY'e dayanıklılık seleksiyonu moleküler markörler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle Doğa Tohumculuk çalışma alanlarından temin edilen her bir patates ıslah hattından alınan genç yapraklardan CTAB yöntemi (Doyle, 1991) kullanılarak genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Analiz edilecek genotiplerden elde edilen dokular doku parçalayıcı cihazı (TissueLyser) yardımıyla öğütülmüş ve hemen ardından DNA izolasyonu yapılmıştır.

3.2.1 Örnek dokularının TissueLyser ile parçalanması

Çalışmaya başlanmadan bir gün önce bitki materyalleri 2 ml'lik tüpler içerisine doku parçalayıcı cihaza ait bilyeler ile birlikte konularak -80 °C olan dolapta saklanmıştır. Ayrıca TissueLyser cihazına ait örnek parçalayıcı hazneleri de bir gün öncesinden -80 °C' de bekletilerek çalışmaya hazır hale getirilmiştir.

Çalışma esnasında ise -80 °C'de bekletilen örnek materyalleri, doku parçalayıcı hazneler içerisine konularak çözülmesi engellenmek için zaman kaybı olmayacak şekilde TissueLyser cihazında öğütülmüştür. TissueLyser cihazı 20-25 1/s hız aralığı ve süresi 5-10 dakika olacak şekilde ayarlanarak çalışılmıştır.

3.2.2 CTAB ekstraksiyon tamponunun hazırlanması

Patates yaprak hücrelerini parçalayıp DNA'yı serbest bırakmak amacıyla CTAB ekstraksiyon tamponu kullanılmıştır. CTAB ekstraksiyon tamponunun içeriği Çizelge 3.3'de sunulmuştur.

Çizelge 3.3. CTAB ekstraksiyon tamponu içeriği

Stok	500ml için miktar	Son konsantrasyon
1 M Tris pH 8	50 ml	100 mM
0.5 M EDTA pH 8	20 ml	20 mM
4 M NaCl	175 ml	1,4 M
CTAB	10 gram	2%
PVP 40	10 gram	2%
Na ₂ S ₂ O ₅	500 mg	0,1%

CTAB ve PVP'nin çözülmesi için çözelti gece boyu karıştırılmıştır. Ardından otoklav yapılmış ve DNA izolasyonunda kullanılabilecek kadar 4 °C'de saklanmıştır.

1 M Tris pH 8.0 (1 litre)

800 ml saf H₂O içerisine 121,1 gram Trisma base eklenmiş ve çözeltinin pH'sı konsantre HCl (yaklaşık 42 ml) ile 8,0'a ayarlanmıştır. Çözelti saf su ile 1 litreye tamamlanmış ve otoklav edilmiştir.

0.5 M EDTA pH 8.0 (1 litre)

800 ml saf H₂O içerisine 186,1 gram EDTA eklenmiş ve çözeltinin pH'sı yaklaşık 20g NaOH peleti ile 8,0'a ayarlanmıştır. Çözelti otoklav yapılarak sterilize edilmiştir.

4 M NaCl

750 ml saf H₂O içerisine 233,77 gram NaCl eklenir ve karıştırılır. Son hacmi saf H₂O ile 1 litreye tamamlanır.

3.2.3 DNA izolasyonu

- 1) CTAB tamponuyla hücrelerin parçalanması,
- 2) Kloroform : İzooamil Alkol aracılığıyla nükleik asit, protein ve diğer hücre kısımlarının ayrıştırılması,
- 3) Soğuk isopropanol ile DNA'nın çöktürülmesi,
- 4) EtOH+NaAc çözeltisi ile DNA'nın yıkanması,
- 5) DNA'nın ultra saf su içerisinde çözülmesi aşamalarından oluşmaktadır.

3.2.3.1 DNA izolasyonu protokolü

- 1- Su banyosu 65 °C'ye ısıtılır.
- 2- Öğütülmüş örneklerin üzerine 900 µl CTAB tampon çözelti eklenir.
- 3- CTAB ve örnek karışımı vorteks ile karıştırılır.
- 4- Karışım 65 °C su banyosunda 1 saat inkübe edilir ve inkübasyon süresince her 10 dk'da bir vorteks ile 5-10 sn karıştırılır.
- 5- İnkübasyondan sonra örnekler su banyosundan çıkarılır ve oda sıcaklığında 5 dk bekletilir.
- 6- Karışım üzerine 900 µl kloroform:İzoamil alkol (24:1) eklenir.
- 7- Karışım yavaşça ters yüz ederek 15 dk karıştırılır.
- 8- Karışımı 14.000 rpm'de 15 dk santrifüj yapılır.
- 9- Üst fazı alınır (≈700 µl) yeni 1,5 ml santrifüj tüpüne aktarılır (Orta ve alt fazdan bulaşma olmamasına dikkat et!)
- 10- Üzerine 500 µl soğuk (-20 °C'de bekletilmiş) isopropanol eklenir.
- 11- Kısa spin yapılır (10.000 rpm'de 5 sn santrifüj) ve sıvı fazı dökülür.
- 12- Pelet içeren tüpe 1 ml 10 mM NaAc içeren % 76'lık EtOH eklenir.
- 13- 15 dk ters yüz karıştırarak yıkanır.
- 14- 7.000 rpm' de 5 sn çöktürülür, üst fazı dökülür.
- 15- Santrifüj tüpünü ağzı açık şekilde steril kabin veya çeker ocak içerisinde kurumaya bırakılır.
- 16- Kuruyan DNA 50 µl saf su ile çözülür.
- 17- DNA miktarının Nanodrop cihazında ölçümü yapılır.
- 18- DNA %1 TBE agaroz jelde elektroforez yapılarak kontrol edilir.

3.2.4 Genomik DNA miktarının spektrofotometre ile tespit edilmesi

İzolasyon sonucu elde edilen DNA'nın miktarı, saf su ile tamamen çözülmesi sağlanan DNA'dan 2 µl kullanılarak spektrofotometre ile ölçümü yapılarak belirlenmiştir.

3.2.5 Genomik DNA'nın kalitesinin jel elektroforezi ile tespiti edilmesi

3.2.5.1 TBE (1 litre) hazırlanması

600-700 ml saf su içerisine 54 gram Tris base, 27,5 gram Boric acid, 200 ml 0,5 M EDTA eklenir ve karıştırılır. Tamamen çözüldükten sonra son hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Bu şekilde 5X TBE hazırlanmış olur.

5X olarak hazırlanan TBE çözelti 0,5X olacak şekilde seyreltilmiştir. 0,5X TBE çözeltisi agaroz jel yapımında kullanılmıştır.

3.2.5.2 %1'lik agaroz jel hazırlanması

100 ml 0,5x TBE içerisine 1 g agaroz eklenir, hazırlanan karışım mikrodalga fırında 3-5 dakika ısıtılarak çözünmesi sağlanır. Elde edilen jelin biraz soğutulması sağlandıktan sonra içerisine 5 µl EtBr (10 mg/ml) ilave edilir.

3.2.5.3 Genomik DNA'nın elektroforez analizi

Hazırlanan jel elektroforez cihazı jel tepsisi içerisine dökülmüş, katılaşması için 20 dakika beklendikten sonra 0,5x TBE ile doldurulan elektroforez cihazına alınmıştır. Jelin ilk ve son kuyucuğuna markör diğer kuyucuklarına ise 6 µl DNA+3 µl yükleme boyası yüklenmiştir.

DNA örnekleri 7V/cm elektrik geriliminde 30 dakika koşturulmuştur. Bu işlem bittikten sonra jel elektroforezden görüntüleme cihazına alınarak genomik DNA kalitesi kontrol edilmiştir.

3.3 DNA'nın Seyreltilmesi

Spektrofotometre cihazında yapılan ölçüme göre belirlenen genomik DNA miktarları “ $M1.V1=M2.V2$ ” formülüne göre hesaplanarak seyreltilmiştir.

DNA örneklerinin;

500 ng/μl'den fazla olanlar 500 ng/μl olarak,
500 ng/μl'den az olanlar 200 ng/μl olarak seyreltilmiş ve
200 ng/μl'den küçük yoğunlukta olanlar ise seyreltilmemiştir.
Böylece çalışmamızda kullanmak amacıyla stok DNA örnekleri (500 ng/μl, 200 ng/μl ve -200 ng/μl) hazırlanmıştır.

3.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PVY'e dayanıklılığın taranması için STM0003 ve RYSC3 moleküler markörleri kullanılarak PCR yapılmıştır. STM0003 ve RYSC3 markörlerine özgü PCR içerikleri ve PCR sıcaklık döngüsü koşulları Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5'de sunulmuştur.

3.4.1 DNA örneklerinin seyreltilmesi

Örneklerin hepsi 5 ng/μl olacak şekilde aynı yoğunlukta seyreltilmiştir.

- Daha önce 500 ng/μl olacak şekilde seyreltilen örnekler için hesaplama;
$$500 \text{ ng/}\mu\text{l} * \text{DNA miktarı}(\mu\text{l}) = 5 \text{ ng/}\mu\text{l} * 200 \mu\text{l}$$
- 200 ng/μl olacak şekilde seyreltilen örnekler için hesaplama;
$$200 \text{ ng/}\mu\text{l} * \text{DNA miktarı}(\mu\text{l}) = 5 \text{ ng/}\mu\text{l} * 200 \mu\text{l}$$
- 200 ng/μl > olacak şekilde seyreltilen örnekler için hesaplama;
$$\text{DNA konsantrasyonu ng/}\mu\text{l} * \text{DNA miktarı}(\mu\text{l}) = 5 \text{ ng/}\mu\text{l} * 200 \mu\text{l}$$

Toplam hacim 200 μl olacak şekilde hesaplanarak saf su ile seyreltilmiştir.

3.4.2 dNTP mix hazırlanması

Her biri 100 mM olan dNTP'lerden (dTTP, dGTP, dCTP, dATP) 100'er μl alınarak 1,5 ml tüp içerisine eklenmiş ve toplam olarak her biri 25 mM konsantrasyonda olacak şekilde 400 μl dNTP çözeltisi hazırlanmıştır.

3.4.3 Primerlerin hazırlanması ve seyreltilmesi

Temin ettiğimiz primerlerimizin üzerinde bulunan etikette yazan nmol miktarı 10 ile çarpılarak sulandırılmıştır. Böylelikle son hacim 100 μM olmuştur. Sıvı hale gelen bu

primerlerden yeni tüpe 5 µl alıp üzerine 95 µl saf su konularak seyreltilmiş, böylece 5 µM konsantrasyonunda primer çalışma çözeltisi hazırlanmıştır.

3.4.4 PCR koşulları

Çalışmada kullanılan, STM0003 ve RYSC3 markörlerine ait PCR koşulları Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.4. STM0003 PCR koşulları

PCR bileşenleri		
DNA (5ng/µl)	15.00 µl	
10X PCR Buffer	2.5 µl	
MgCl ₂ (25 mM each)	2.00 µl	
dNTPs (25 mM each)	0.40 µl	
STM0003 F (5 µM)	1.50 µl	
STM0003 R (5 µM)	1.50 µl	
DNA Taq polymerase (5 U/µl)	0.30 µl	
dH ₂ O	1.80 µl	
Total	25.00 µl	
PCR Çoğaltma Koşulları		
1.Adım- İlk denatürasyon	94 C 3 min	} 40 döngü
2.Adım- Denatürasyon	94 C 30 sec	
3.Adım- Bağlanma	50 C 45 sec	
4.Adım- Uzatma	72 C 45 sec	
5.Adım- Son uzatma	72 C 10 min	
	+4 C ∞	
AMPLİCON SİZE		111-140 bp

Çizelge 3.5. RYSC3 PCR koşulları

PCR bileşenleri	
DNA (5ng/μl)	10.00 μl
10X PCR Buffer	2.5 μl
MgCl ₂ (25 mM each)	2.00 μl
dNTPs (25 mM each)	0.40 μl
3.3.3s (5 μM)	1.50 μl
ADG23 R (5 μM)	1.50 μl
DNA Taq polymerase (5 U/μl)	0.30 μl
dH ₂ O	6.80 μl
Total	25.00 μl
PCR Çoğaltma Koşulları	
1.Adım-İlk denatürasyon	93 C 9 min
2.Adım-Denatürasyon	94 C 45 sec
3.Adım-Bağlanma	58 C 45 sec
4.Adım-Uzatma	72 C 60 sec
5.Adım-Son uzatma	72 C 5 min
	+4 C ∞
AMPLİCON SİZE	321 bp

3.5 PCR Ürünlerinin Analizi

Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen PCR ürünleri Qiagen Qiaxcel Advanced cihazında analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre ise incelenen popülasyondaki bireyler dayanıklı ve hassas olarak değerlendirilmiştir.

3.5.1 Kapiler elektroforez cihazı çalışma protokolü

Cihazın Hazırlanması

1. Qiaxcel DNA Screening kit (store 2-8 °C) program açıldıktan sonra cihaza yerleştirilmiştir.
2. Alignment marker ; cihazın “marker 1” bölümüne yerleştirilmiştir.
3. Size marker; A1 bölümüne konulmuştur.
4. Örnekler oda sıcaklığına gelecek şekilde hazırlanmıştır.
5. 20-30 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra çalışmaya başlanmıştır.

Programın Çalıştırılması

1. Process Profile:

Mode; DNA Screening

Process profile; New Process

Profile; Cartridge Type: DNA Screening

Included Steps; Run, Analysis, Report işaretlenmiştir.

Experiment Directory; Çalışmanın kaydedileceği yer seçilmiş ve Allow Directory Selection işaretlenmiştir.

2. Run Parameters:

- a. Örneklerimizi (en az 15 µL) yerleştirdiğimiz bloklar seçilmiştir. (Not: A1, Mouse sağ tık ile Size Marker seçilir.)
- b. İşaretlenen bloklarda boş kalan kuyucuk var ise QX DNA Dilution Buffer (en az 15 µL) eklenmiştir.
- c. Çalışmamızda kullanılan STM0003 ve RYSC3 primerleri için AM320 metodu seçilmiştir. Kullandığımız bu metodun enjeksiyon süresi 60 saniye olarak ayarlanmıştır.

3. Analysis:

Seçilen metoda göre “Analysis Properties” ayarlıdır.

Profile; Default DNA seçilmiştir.

4. Marker:

Marker Selection; “Run size marker side by with sample “ seçilmiştir.

Not: Boyut markörü (Size marker) ilk çalışmada tanıtıldıktan sonra tekrar kullanmaya gerek yoktur. “Reference Marker Table” seçilir. “Reference Marker” bölümünde daha önce tanıttığımız “size marker” işaretlenir.

5. Report/export:

Elde edilen sonuçlar hangi formatta kaydetmek isteniliyorsa ona göre işaretlenmiştir.

6. Sample Selection:

- a. Plate ID; Çalışmanın ismi belirtilmiştir.
- b. Experiment Direction; Çalışmanın kaydedileceği yer seçilmiştir.
- c. Reference Merker; “Run size marker side by with sample “ seçilmiştir.
- d. Alignment marker ; kullanılan markerin baz uzunluk aralığı seçilmiştir.

7. Sample Information:

Burada kuyucuklara koyduğumuz örneklerin isimleri isteğe bağlı olarak yazılır.

8. Run Check:

Please Confirm; “ All selected sample rows contain samples”

“ Alignment marker is loaded”

“ Size marker is loaded” seçilmiştir.

Eğer yaptığımız işlemlerde hata varsa “Errors and Warmings” bölümünde bizi hata yapılan yere yönlendirecek uyarı verir.

Hata yoksa **“RUN”** tuşu yeşil yanmış ve çalışma başlatılmıştır.

BÖLÜM IV

BULGULAR VE TARTIŞMA

Son yıllarda patates ıslah programlarında hastalıklara ve zararlılara dayanıklı yeni çeşitlerin geliştirilmesinde ilgili genlere bağlı moleküler markörler geliştirilmiş ve seleksiyonda başarıyla kullanılmaktadır (Bakker vd., 2011; Caromel vd., 2005; Flis vd., 2005; Gebhardt vd., 2006; Gebhardt ve Valkonen, 2001; Simko vd., 2007).

Bu tez çalışmasında ise moleküler markörler kullanılarak PVY'ye karşı dayanıklılık genlerini içeren ıslah hatlarının tespit edilmesi hedeflenmiştir. Yapılan çalışmalarda incelenen popülasyonlardaki bireyler PVY'ye dayanıklı ve hassas olarak değerlendirilmiştir.

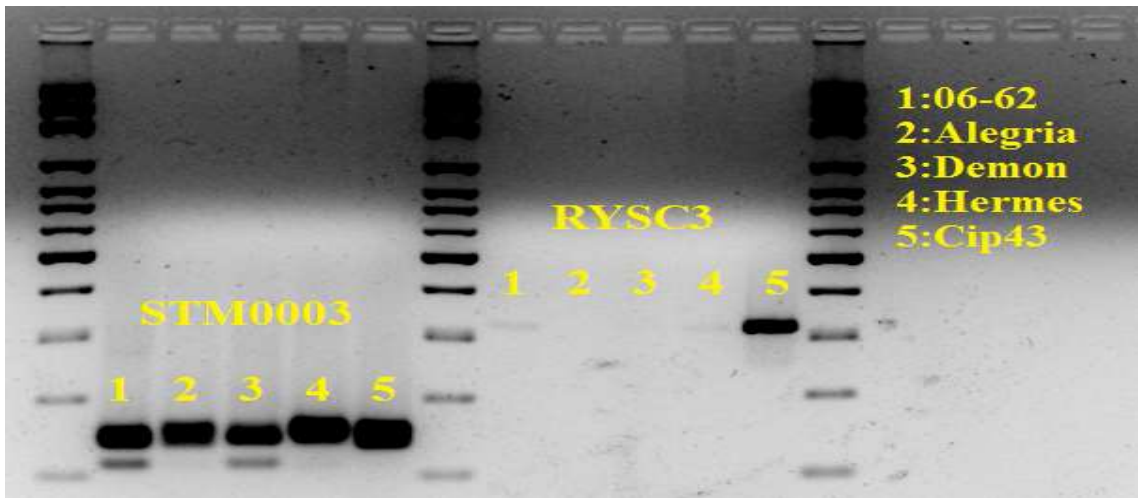
4.1 Kullanılacak Analiz Yönteminin Belirlenmesi

PCR yöntemi ile sonuç alabilmek için uzun zaman alan jel-elektroforez yöntemi ile uğraşmak gereklidir (Jones vd., 2003). Bu da daha fazla iş gücü ve zaman demektir. Bu nedenle çalışmaya başlanmadan önce iş gücünü azaltmak ve sonuçları daha kısa sürede analiz edebilmek için kapiler elektroforez yöntemi ve jel elektroforez yöntemi kullanılarak ön çalışma yapılmış olup en uygun yöntem belirlenmiştir. Ayrıca yapılan bu ön çalışmada kullanacağımız yöntemlerin doğruluğunun karşılaştırılması amaçlanmıştır. Kapiler elektroforez yöntemi agaroz jel elektroforez yöntemine göre daha hassastır, bu yöntemle iş gücünden ve zamandan tasarruf sağlanmaktadır. Kapiler elektroforez cihazında jel dökme ve jel yükleme işlemi olmadığı için kullanımı daha kolaydır. EtBr gibi kanserojen kimyasallarla temas edilmemektedir ve geniş aplikasyon alanı (genotiplendirme, ıslah çalışmaları, SSR, STR, RFLP, AFLP, multiplex PCR) bulunmaktadır. Kapiler elektroforez cihazının 12 örneği 3-15 dakika içinde analiz edebilme kapasitesi ve tek seferde 96 örneğin elektroforez analizini yapabilen tam otomatik sistem olması gibi özellikleriyle DNA ve RNA çalışmalarında büyük kolaylık sağlamaktadır. Ancak her iki yöntemde maliyet hesaplaması yapıldığı zaman Qiagen Kapiler Elektroforez cihazına göre jel elektroforez sisteminin daha ucuz bir yöntem olduğu anlaşılmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız bir örnek maliyeti; Kapiler Elektroforez cihazında: 2,76 TL, Agaroz Jel Elektroforez sisteminde; 1,04 TL olarak

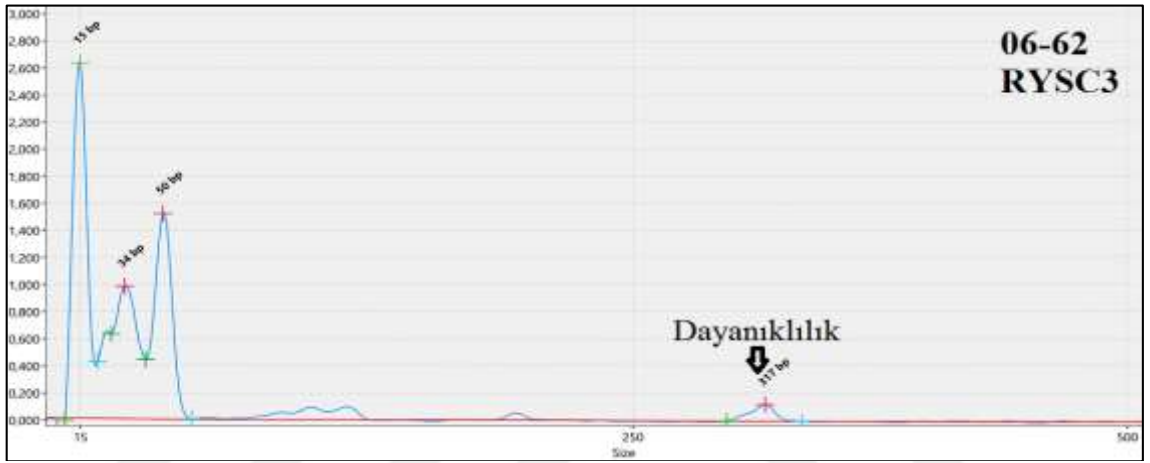
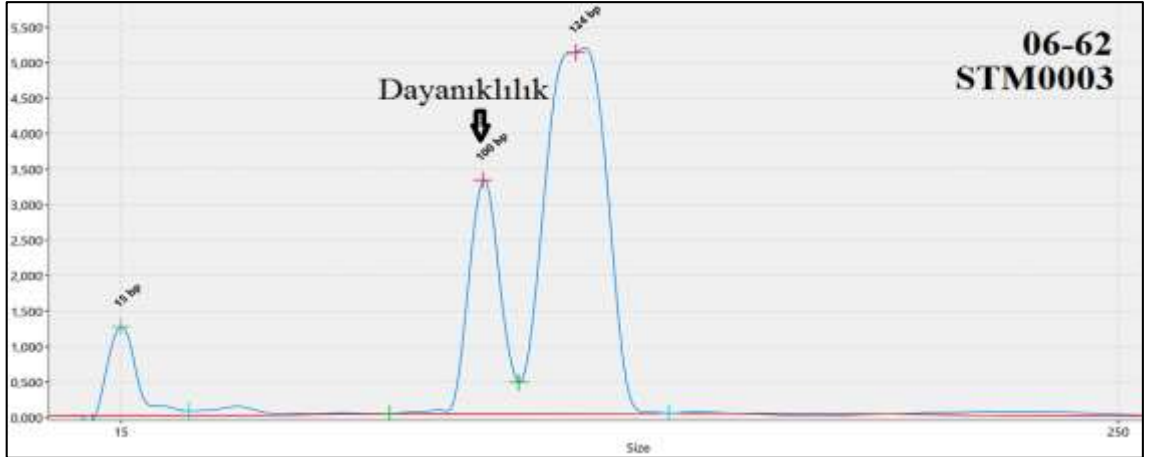
hesaplanmıştır. Bu hesaplama sonucunda kapiler elektroforez sisteminin daha pahalı olmasına rağmen daha hassas ve daha hızlı sonuç verdiği için bu çalışmada kapşler elektroforez yönteminin kullanılması tercih edilmiştir.

Analiz yönteminin belirlenmesi amaçlı yapılan çalışmada, daha önceki araştırmalarda dayanıklı olarak belirlenmiş 06.62, Alegria, Demon, Hermes ve CIP43 patates genotipleri kullanılmıştır. Kullanılan 5 farklı genotip RYSC3 ve STM0003 isimli seleksiyon markörleri ile taranmıştır. Bu iki seleksiyon markörü ile yapılan çalışma sonucu oluşan PCR ürünleri analiz edilmiştir. Kapiler elektroforez cihazında ve agaroz jel elektroforez cihazında analiz edilerek sonuçlar karşılaştırılmıştır. Analiz sonuçları Şekil 4.1-4.6 ve Çizelge 4.1’de verilmiştir. STM0003 primerinin analiz görüntülerinde dayanıklılık genini belirleyen iki band (agaroz jelde ≈ 140 ve 111 bç) bulunurken hassas genotiplerde tek band (agaroz jelde ≈ 140 bç) bulunmaktadır. RYSC3 primerinde ise dayanıklılık geni tek band (agaroz jelde 321 bç) ile belirlenirken hassas genotiplerde band bulunmamaktadır.

İki yöntemle elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır ve genel dayanıklılık bakımından elektroforez jel sonuçlarının doğruluk oranı %80 olmasına karşılık Qiaxcel cihaz sonuçları doğruluk oranı % 100 olarak analiz edilmiştir. Bu yüzden hem daha hassas sonuç verdiği için hem de ıslah hatlarında iş gücünden tasarruf sağlanması amacıyla çalışmaya Kapiler elektroforez cihazı kullanılarak devam edilmiştir.

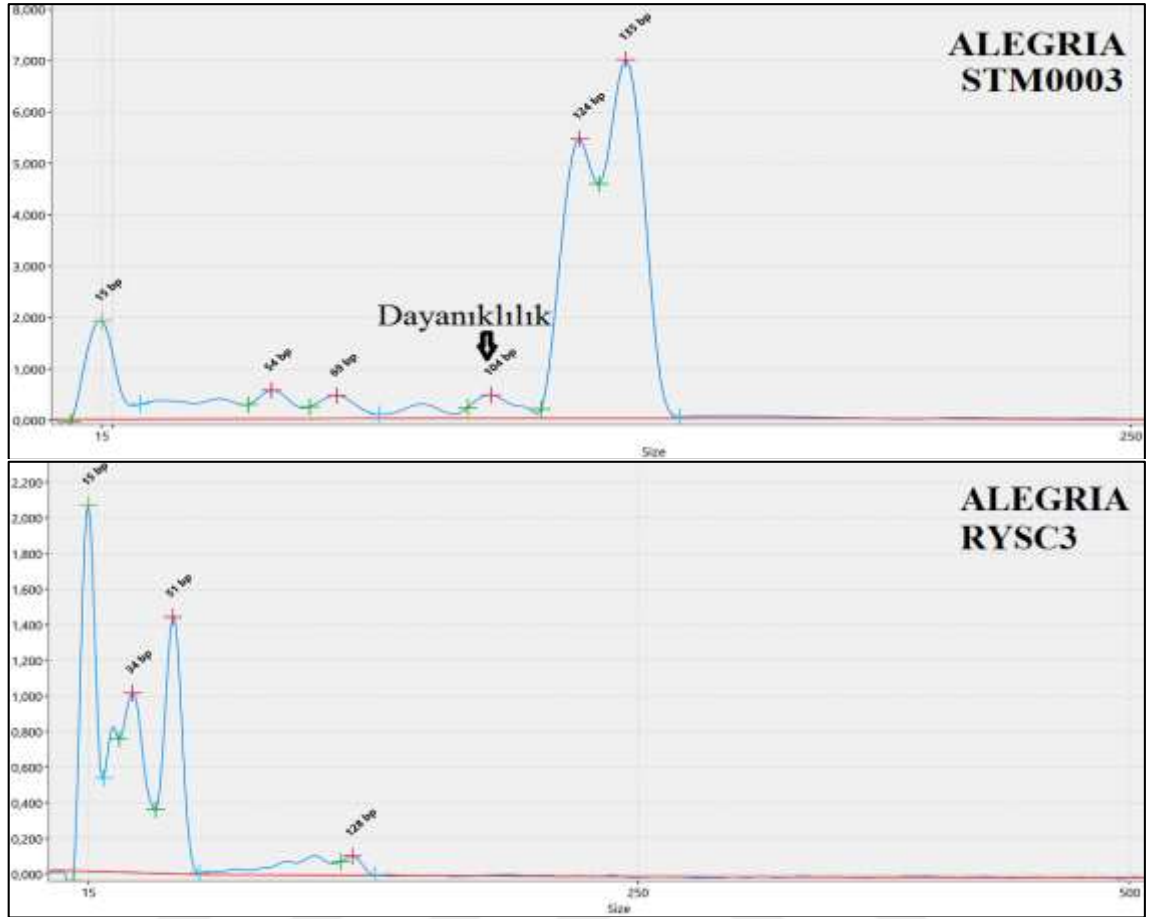


Şekil 4.1. Ön çalışma elektroforez jel görüntüsü

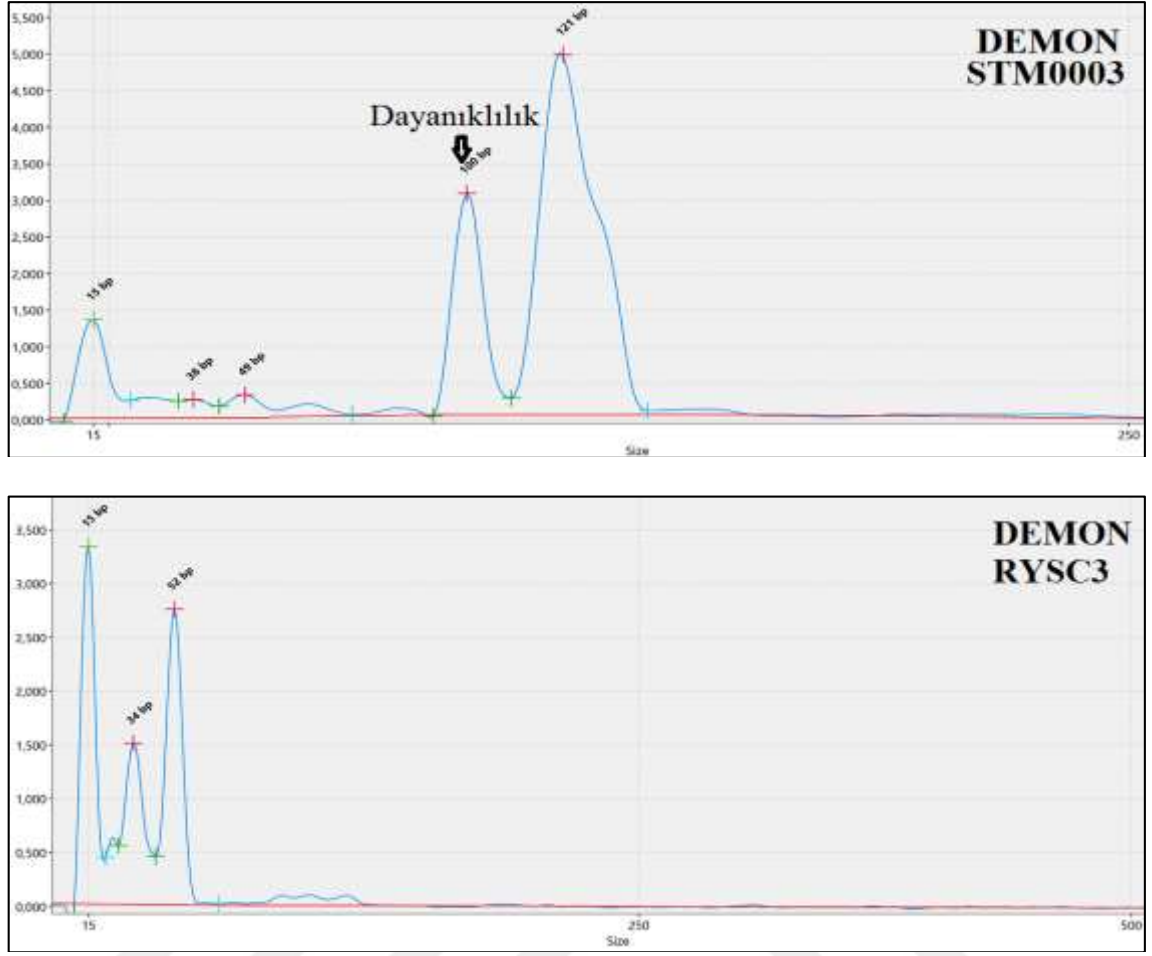


Y eksen: Oransal ışıma miktarı **X eksen:** Baz çifti uzunluğu (bp)

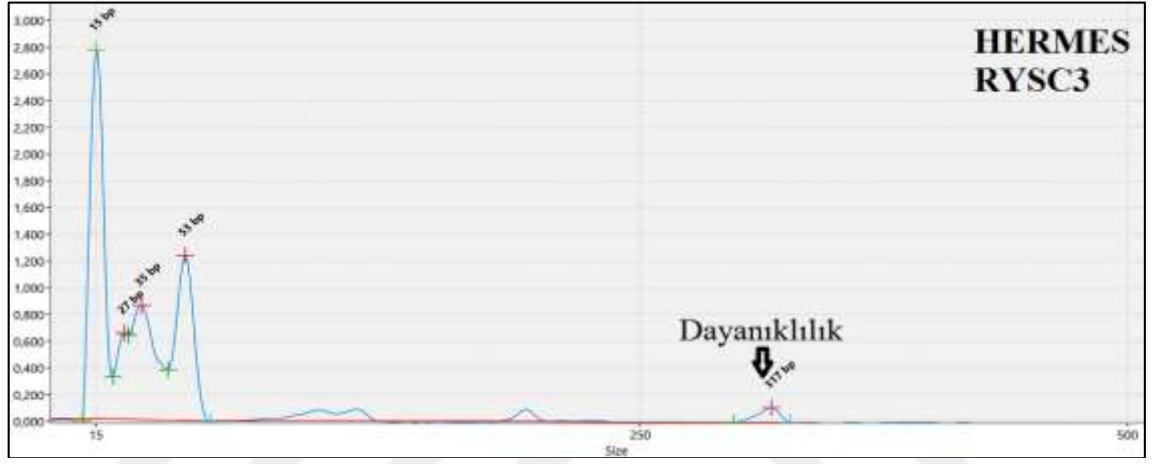
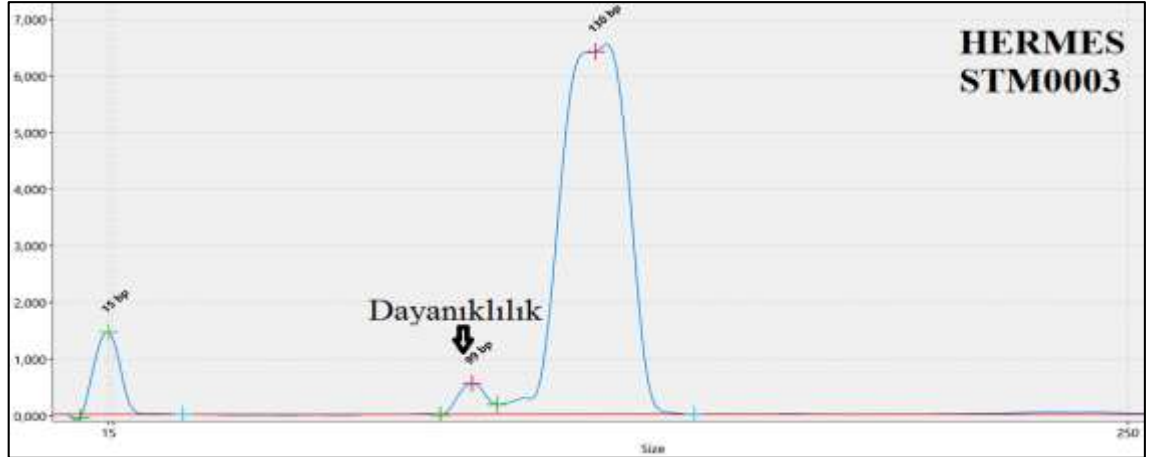
Şekil 4.2. 06-62 çeşidinin STM0003 ve RYSC3 primerleri ile PCR ürünlerinin Kapiler elektroforez cihazında analiz sonuçlarının görüntüleri



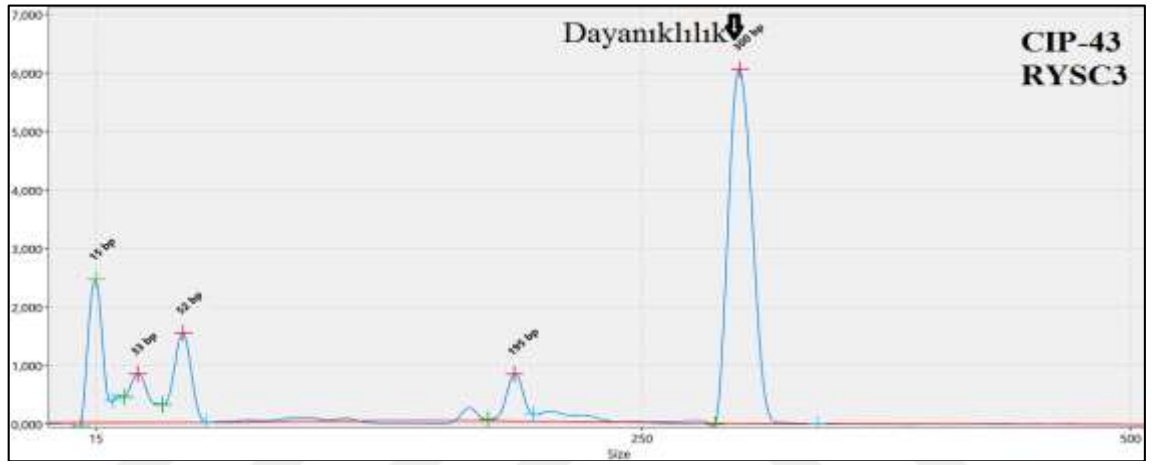
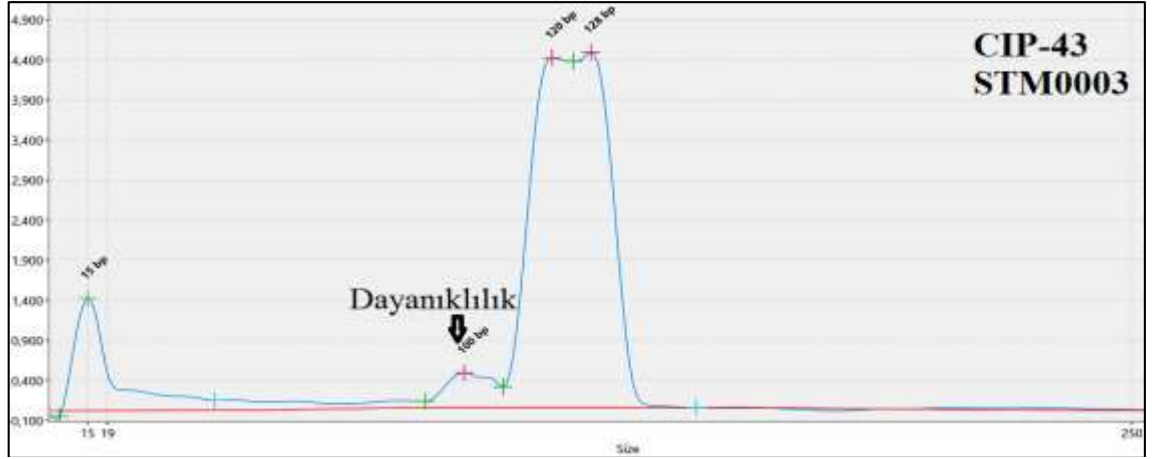
Şekil 4.3. Alegria çeşidinin STM0003 ve RYSC3 primerleri ile PCR ürünlerinin Kapiler elektroforez cihazında analiz sonuçlarının görüntüleri



Şekil 4.4. Demon çeşidinin STM0003 ve RYSC3 primerleri ile PCR ürünlerinin Kapiler elektroforez cihazında analiz sonuçlarının görüntüleri



Şekil 4.5. Hermes çeşidinin STM0003 ve RYSC3 primerleri ile PCR ürünlerinin Kapiler elektroforez cihazında analiz sonuçlarının görüntüleri



Şekil 4.6. CIP-43 çeşidinin STM0003 ve RYSC3 primerleri ile PCR ürünlerinin Kapiler elektroforez cihazında analiz sonuçlarının görüntüleri

Çizelge 4.1. Ön çalışma analiz sonuçları

Örnek adı	06-62	ALEGRIA	DEMON	HERMES	CIP-43
JEL					
STM0003	1	0	1	1	0
RYSC3	1	0	0	1	1
Dayanıklılık	D	H	D	D	D
QIAXCEL					
STM0003	1	1	1	1	1
RYSC3	1	0	0	1	1
Dayanıklılık	D	D	D	D	D

D:Dayanıklı **H:** Hassas

4.2 Markör Kontrol Amaçlı Yapılan Çalışma Analizlerinin Değerlendirilmesi

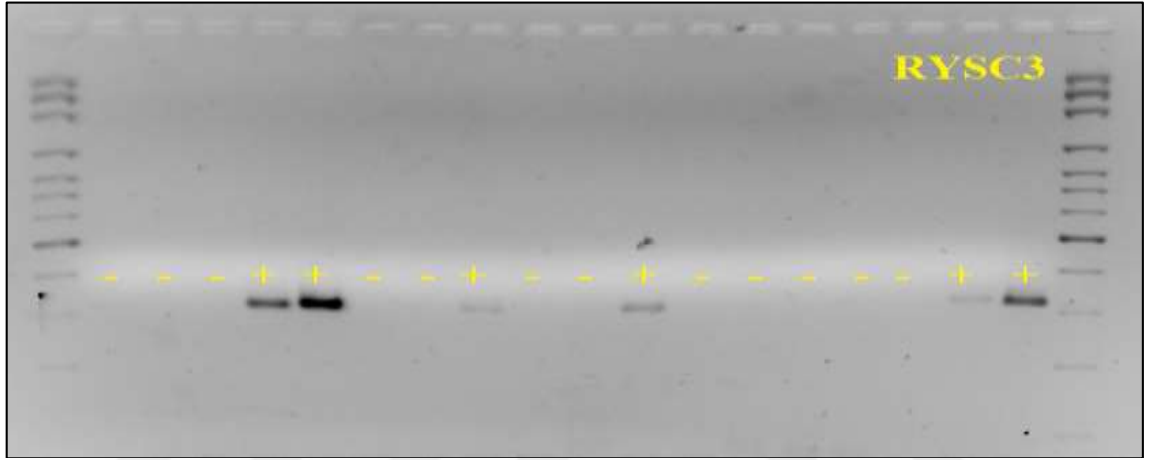
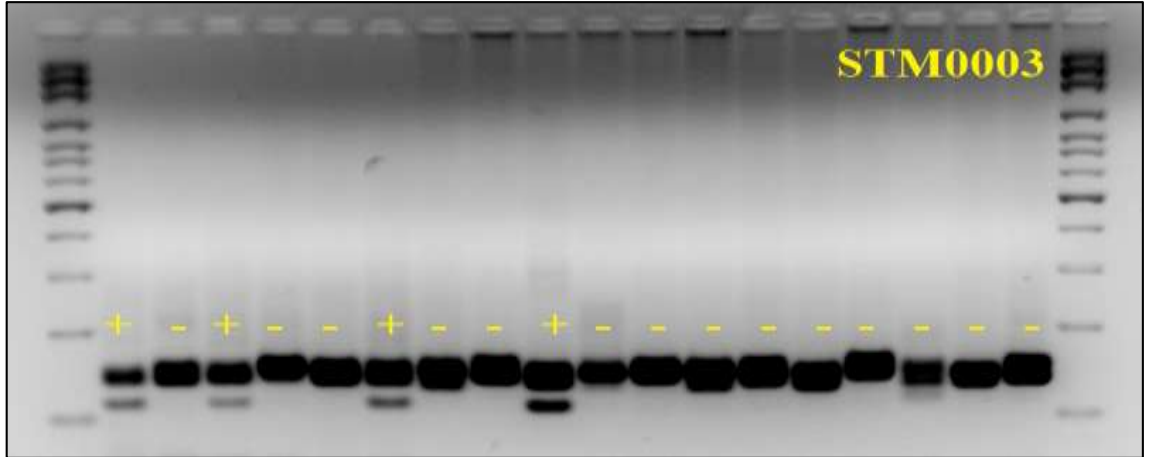
Moleküler markörlerin patates ıslahında ve ayrıca diğer bazı bitki türlerinin ıslahında ilerlemeye yol açan önemli bir araç olduğu düşünülmektedir (Watanabe vd., 1994). PVY'ye yüksek dayanıklılık, enfeksiyonun erken bir aşamasında virüs çoğalmasını önleyen tek, baskın genler (Ry olarak adlandırılır) ile sağlanır (Barker ve Harrison, 1984). *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* (Ry_{adg}) ve *S. stoloniferum*'un (Ry_{sto}) PVY'ye yüksek dayanıklılık sağladığı bilinmektedir (Barker, 1997; Hämäläinen vd., 1997). *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*'dan aşırı dayanıklı gen Ry_{adg}, kromozom XI üzerinde haritalanmıştır (Hämäläinen vd., 1997). Ry_{adg}'nin tespiti için geliştirilen (Kasai vd. 2000), RYSC3 markörü, PVY'ye dayanıklı patates hatlarının belirlenmesi için ıslahta kullanılmıştır (Ruiz de Arcaute vd., 2002).

Bu tez çalışmasında da Ry_{adg} ve Ry_{sto} genleri ile ilgili iki moleküler markör (sırasıyla RYSC3 ve STM0003) kullanılmıştır. Çalışmaya başlamadan önce bu iki moleküler markör kullanılarak kontrol amaçlı tarama yapılmıştır. Ry_{adg} taşıyan dayanıklı genotiplerde tek bant elde edilirken hassas genotiplerde bant gözlenmemiştir. Ayrıca Ry_{sto} taşıyan dayanıklı genotiplerde iki bant (agaroz jelde ≈ 140 ve 111 bç) elde edilirken, hassas genotiplerde tek bir bant (agaroz jelde ≈ 140 bç) gözlenmiştir.

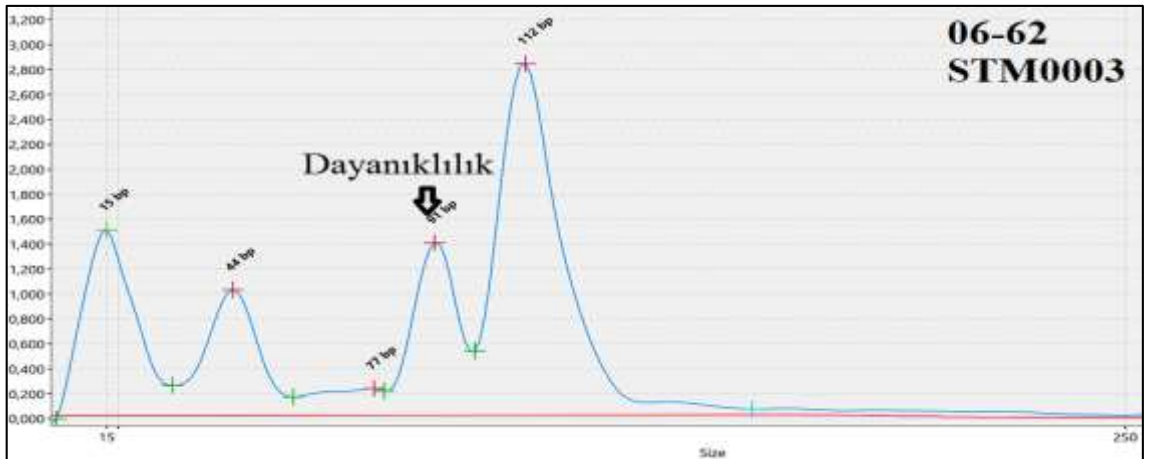
- Bu kontrol amaçlı çalışmada, daha önceki araştırmalarda dayanıklı ve hassas olarak belirlenmiş 18 genotip kullanılmıştır (www.europotato.org; <https://research.cip.cgiar.org/redlatinpapa/pages/home.php>). Kullanılan 9 dayanıklı ve 9 hassas olmak üzere 18 farklı genotip RYSC3 ve STM0003 isimli seleksiyon markörleri ile taranmıştır. Bu iki seleksiyon markörü ile yapılan çalışma sonucu oluşan PCR ürünleri analiz edilmiştir. Analiz sonuçları kapiler elektroforez cihazında ve jel elektroforez cihazında değerlendirilmiştir. Analiz sonuçları Şekil 4.7-4.8 ve Çizelge 4.2'de verilmiştir. Bu çalışmanın sonucuna göre;
- STM0003 ve RYSC3 markörleri kullanılarak hem kapiler elektroforez hem de jel elektroforez yöntemleri aracılığıyla yapılan tarama sonucunda 9 dayanıklı patates genotipinin 4 tanesinin Ry_{sto} genine bağlı STM0003 markörünü, 3 tanesinin ise Ry_{adg} geninine bağlı RYSC3 markörünü içerdiği belirlenmiştir. Böylece, dayanıklı olduğu bilinen 9 genotipin 7 tanesi dayanıklı, 2 tanesi

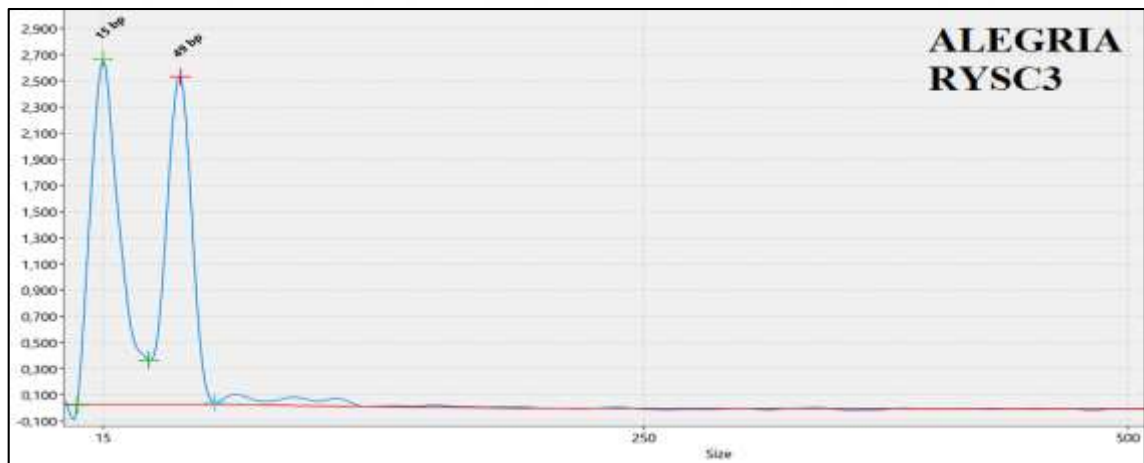
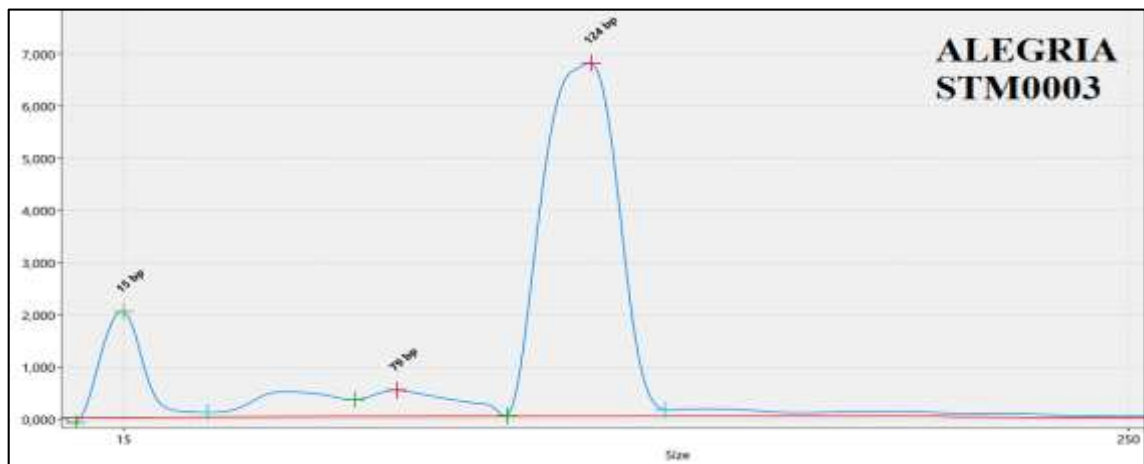
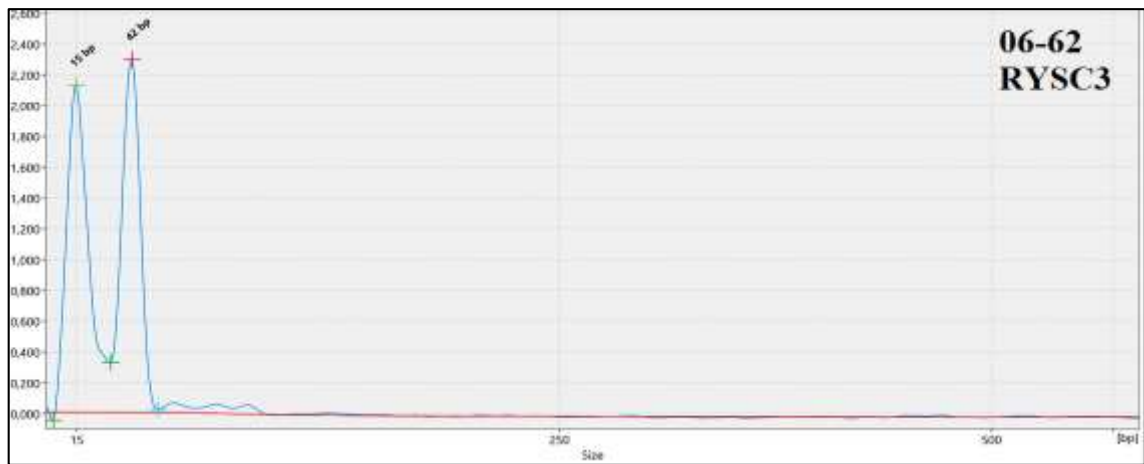
(Alegria ve CIP398098-205) ise hassas olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, iki markör bir arada değerlendirildiğinde dayanıklı genotiplerin %78'i doğru bir şekilde tespit edilebilmiştir. .

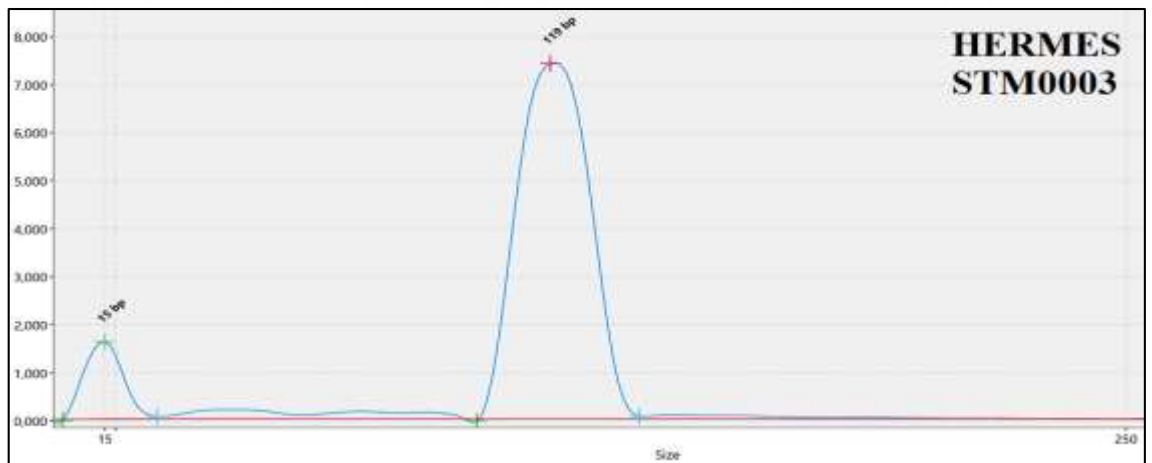
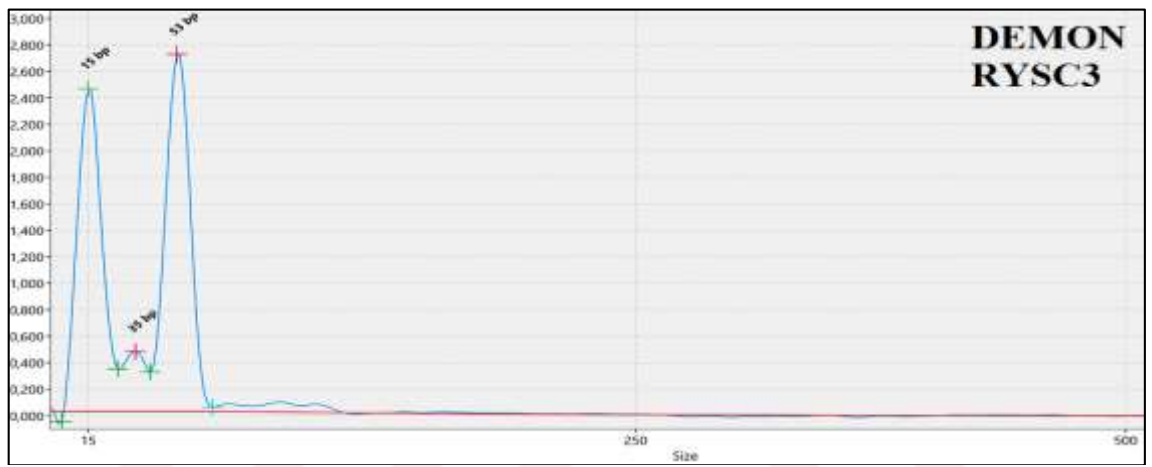
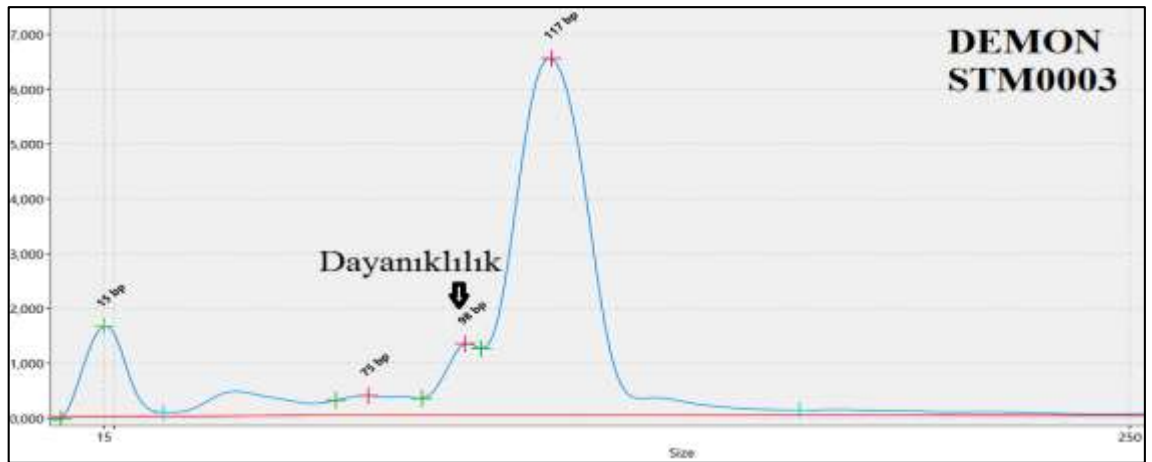
- Hassas olarak bilinen genotiplerin hiç birisinde Ry_{sto} genine bağlı STM0003 markörü bulunmazken, 3 tanesinde ise Ry_{adg} genine bağlı RYSC3 markörü belirlenmiştir. RYSC3 seleksiyon markörünün hassas genotiplerin % 33'n dayanıklı olarak belirlediği gözlenmiştir. Bu durumda bir patates ışlahısı, bir ışlah programındaki PVY'ye hassas hatların $\approx 67\%$ 'sini doğru bir şekilde eleyebilecektir.
- Genel olarak, STM0003 ve RYSC3 markör sonuçları bir arada değerlendirildiğinde patates genotiplerinin PVY'ye dayanıklılık ve hassasiyet durumları % 72 doğruluk oranı ile belirlenmiştir.
- Sonuç olarak, STM0003 ve RYSC3 markörlerinin patates ışlah programına entegre edilmesi durumunda, PVY'dayanıklı hatların çok önemli bir kısmı programın erken dönemlerinde belirlenebilecektir. Bu durum, ışlah programının ileri aşamalarına daha az sayıda ışlah hattının taşınmasına, böylece alandan, iş gücünden ve diğer girdi maliyetlerinden tasarruf edilmesine yardımcı olacaktır.

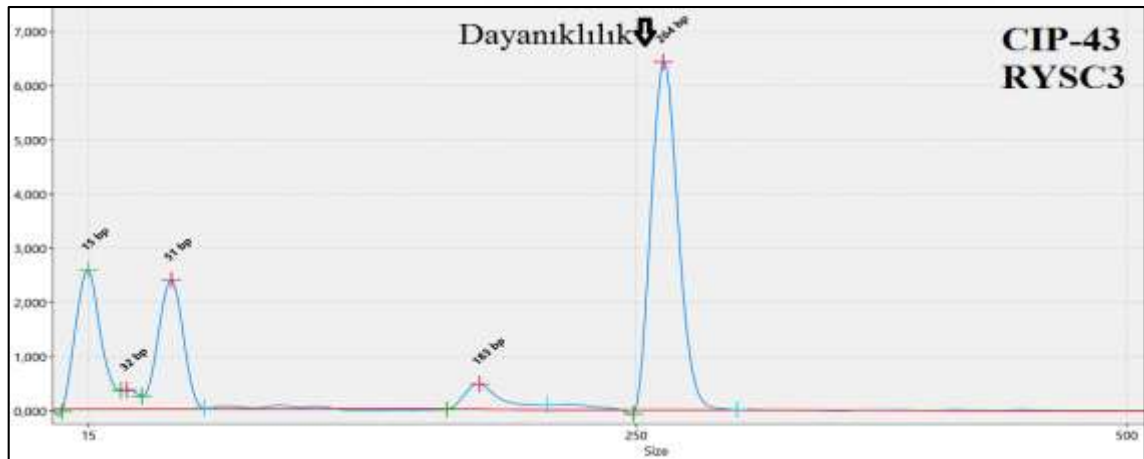
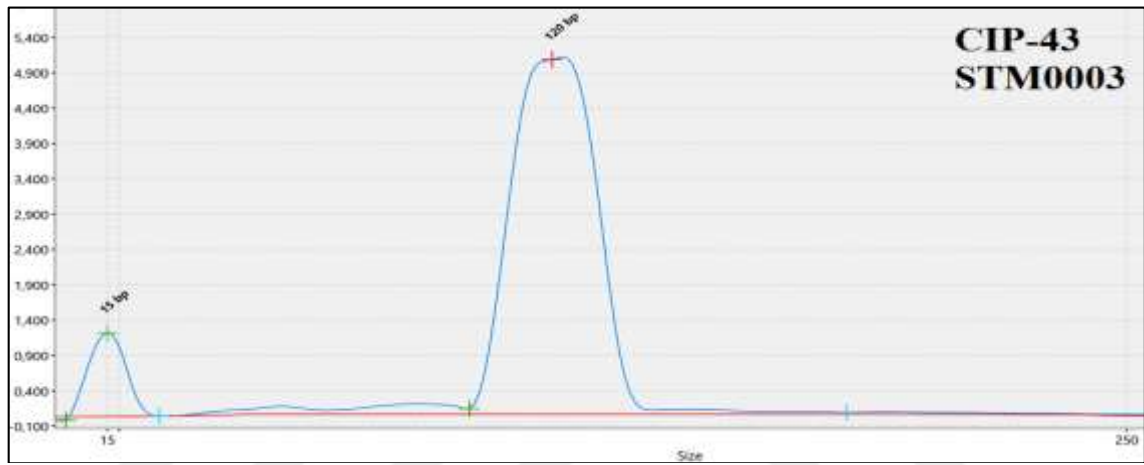
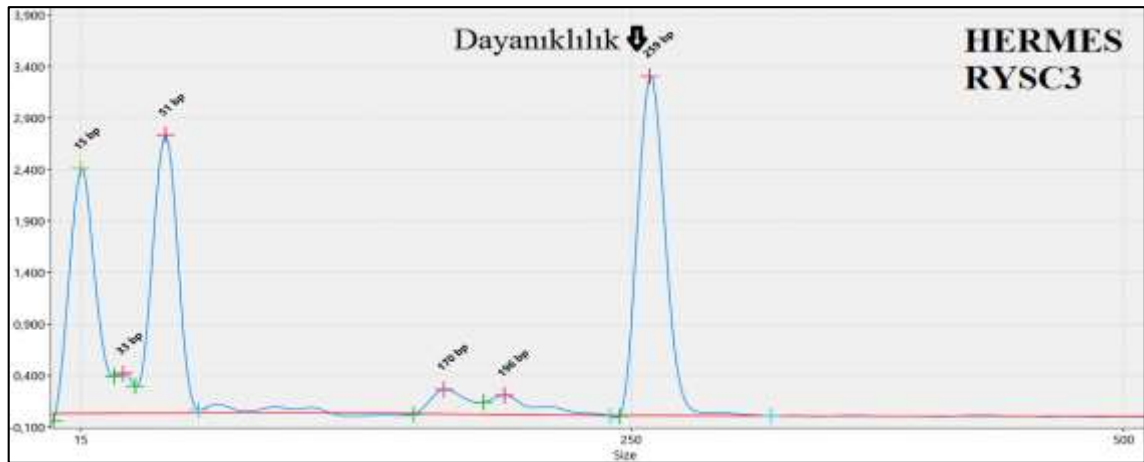


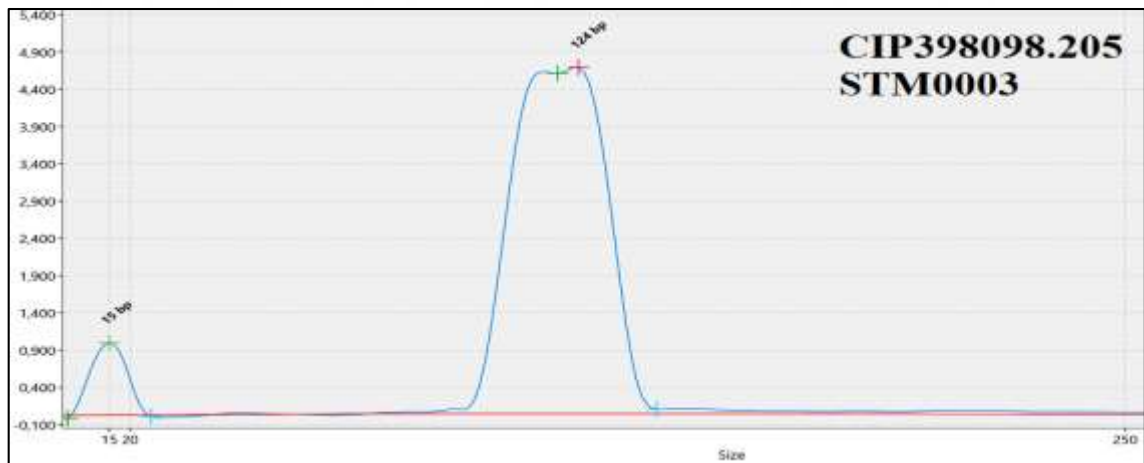
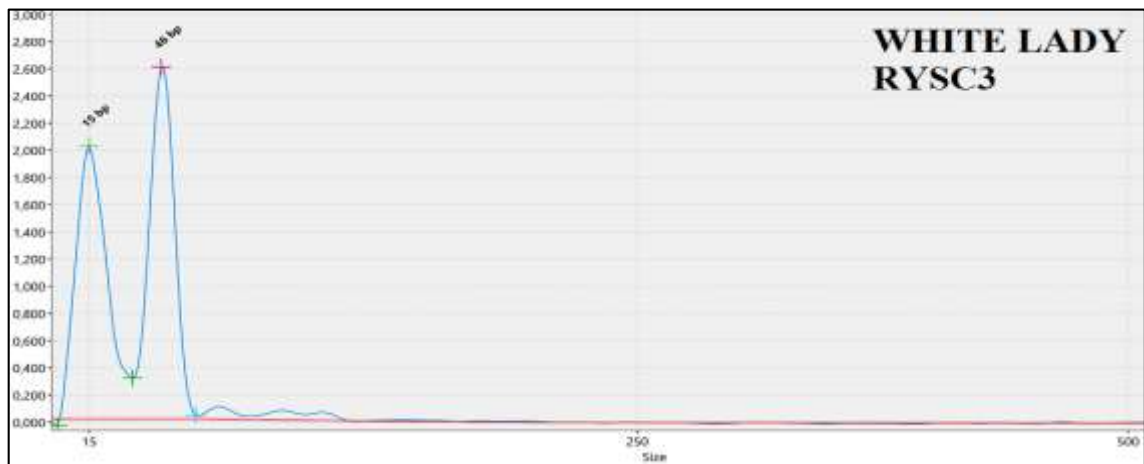
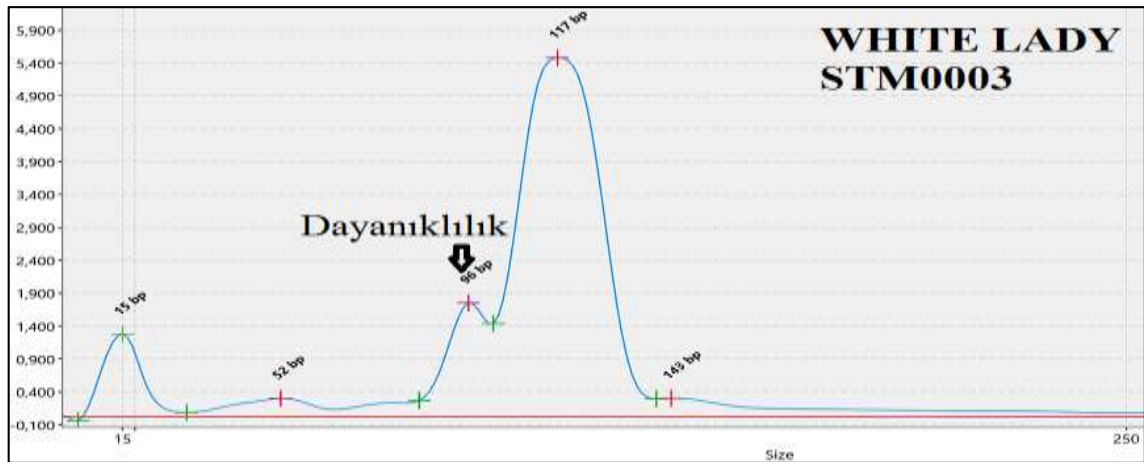
Şekil 4.7. Dayanıklı ve hassas çeşitlerle markör kontrol amaçlı yapılan PCR ürünleri elektroforez jel görüntüleri

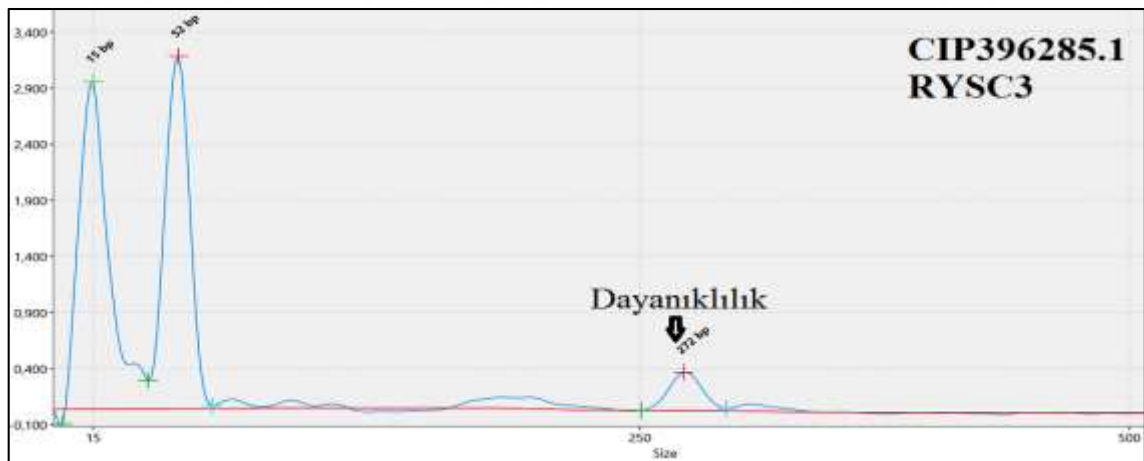
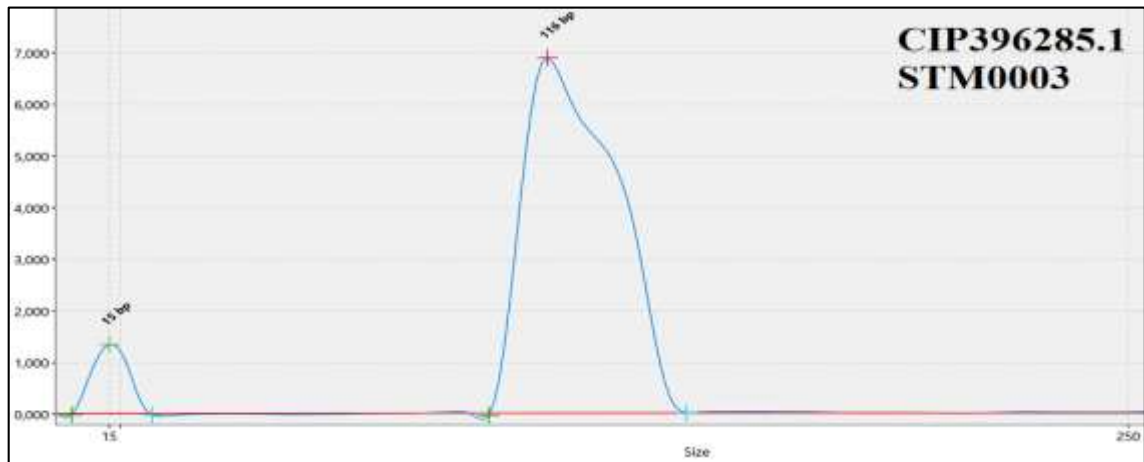
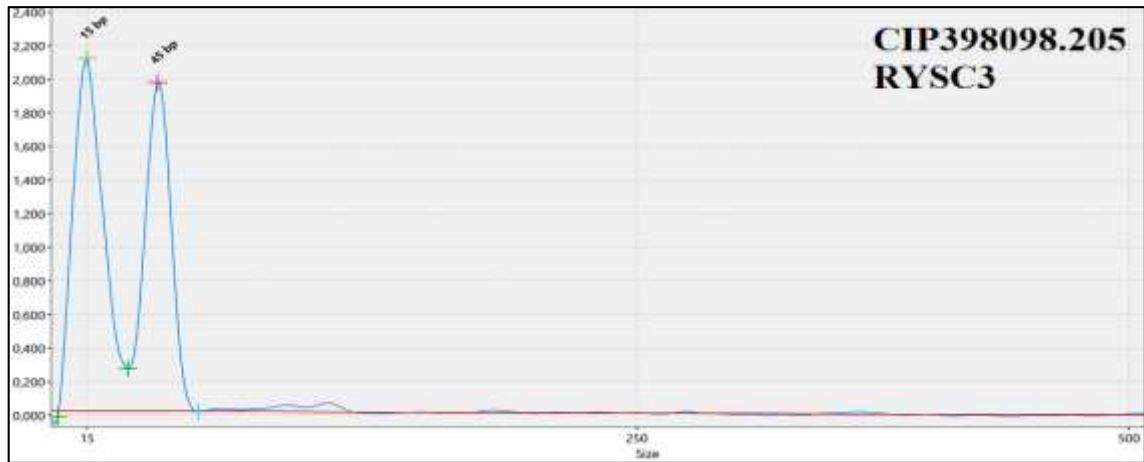


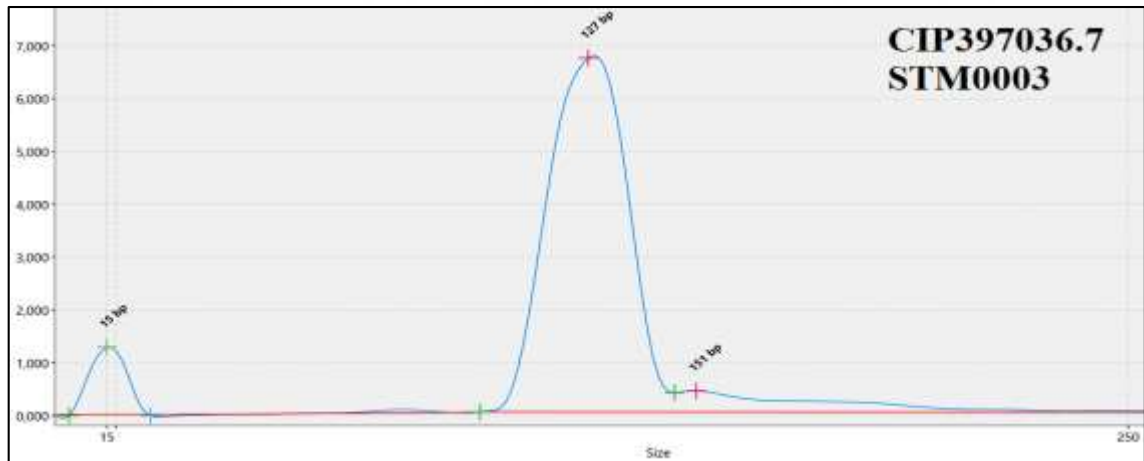
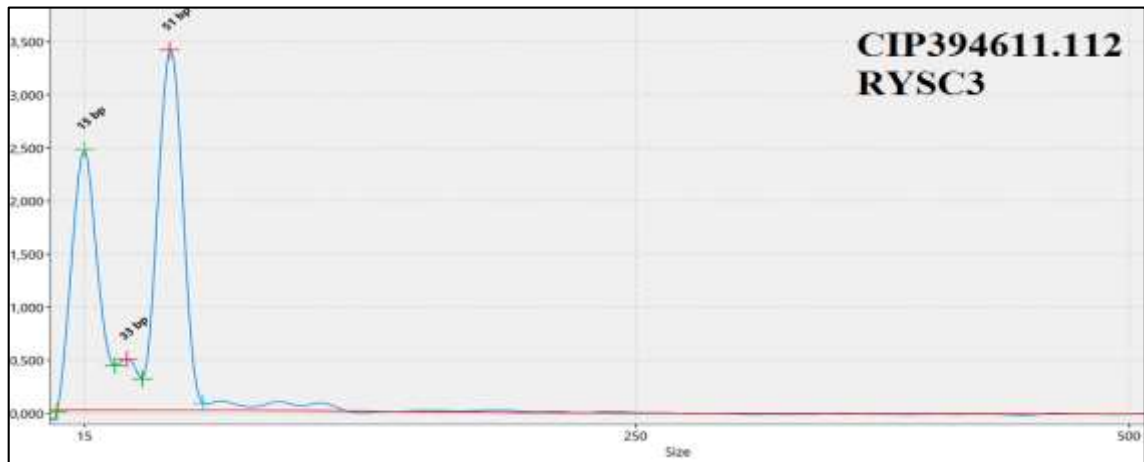
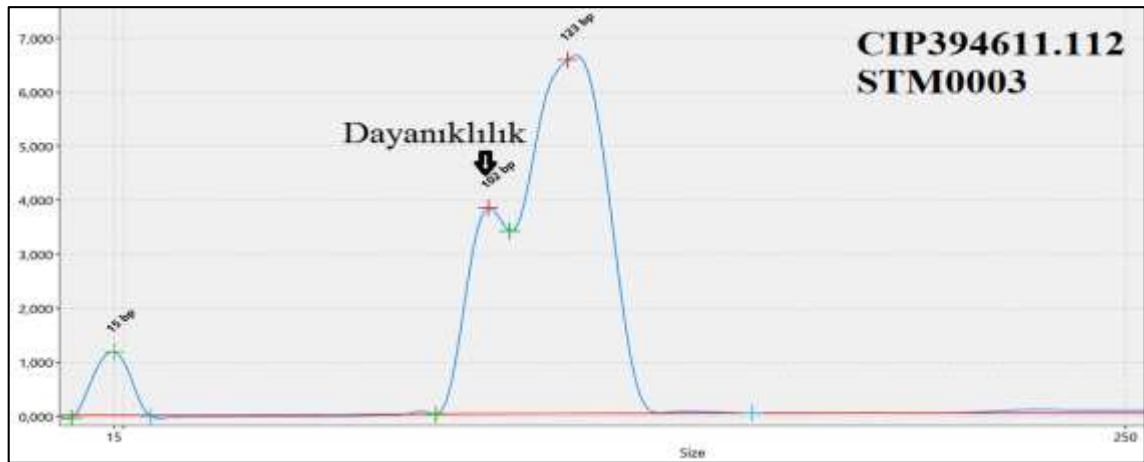


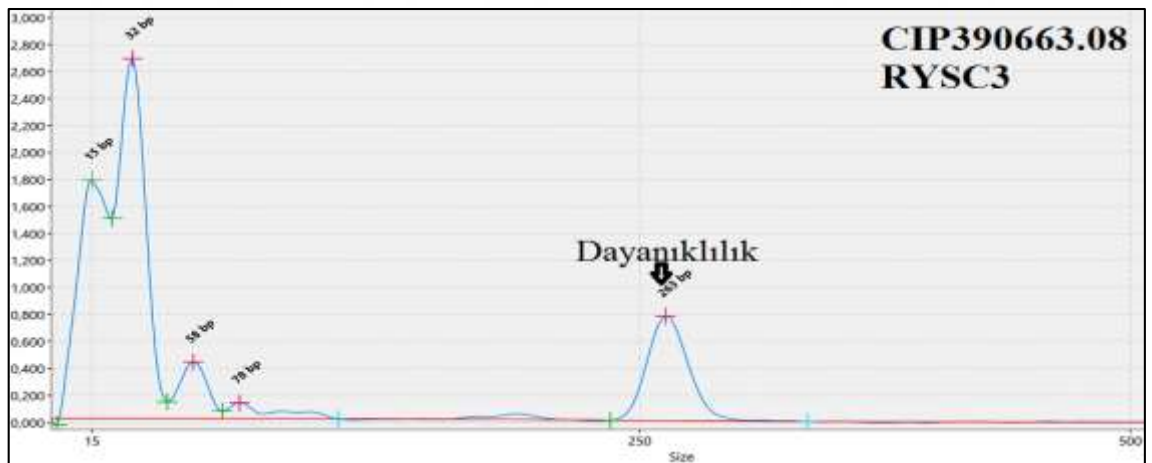
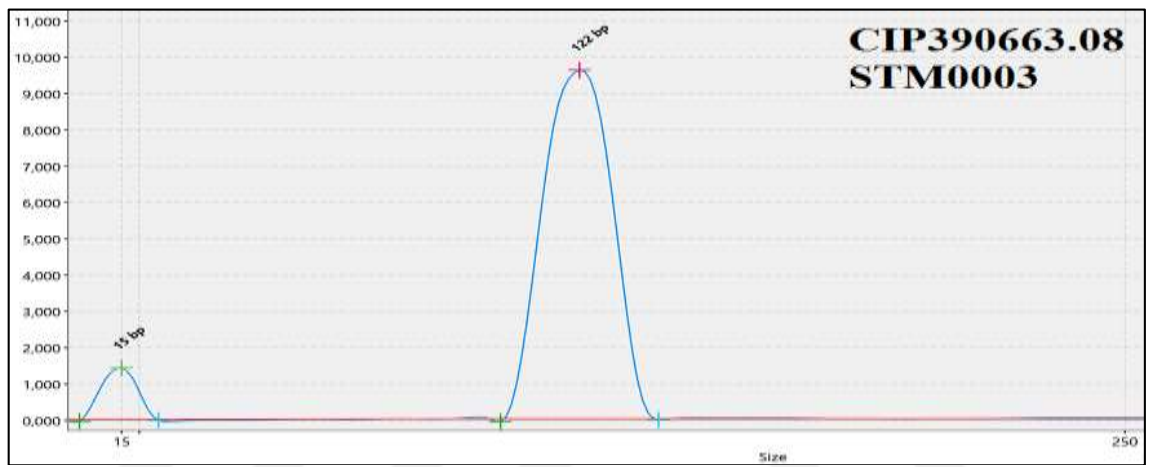
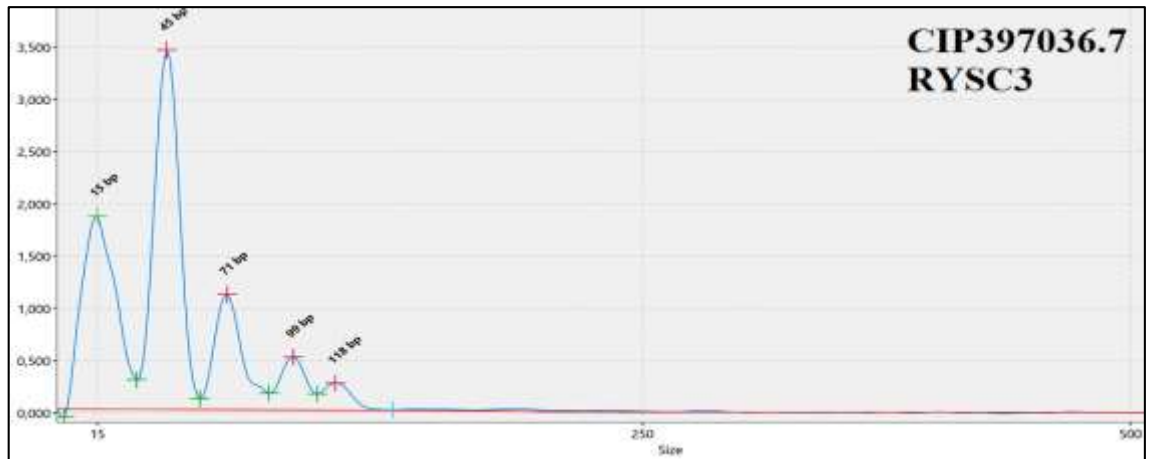


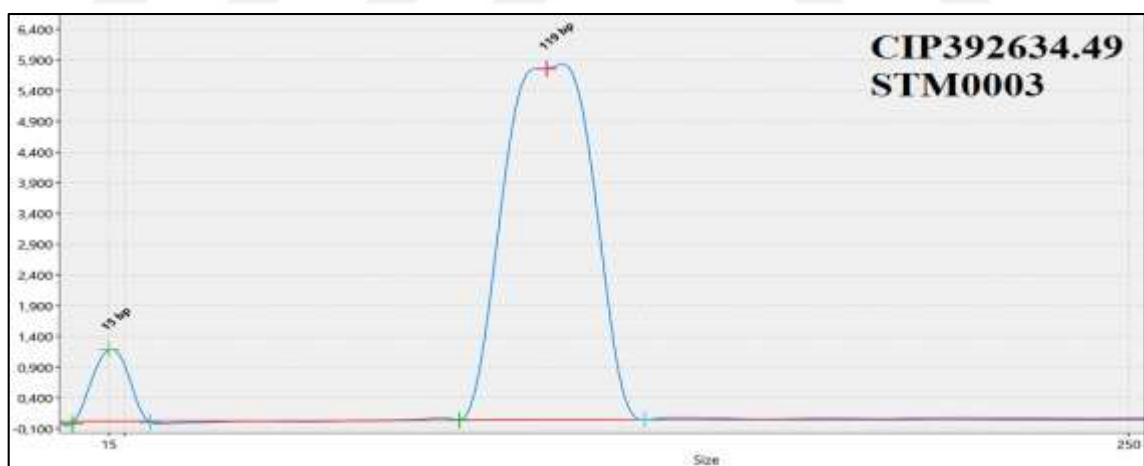
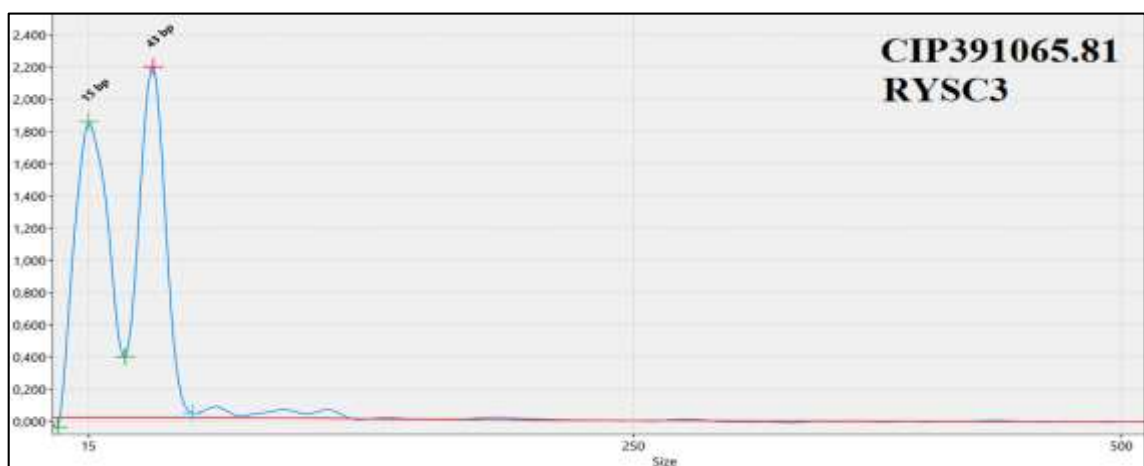
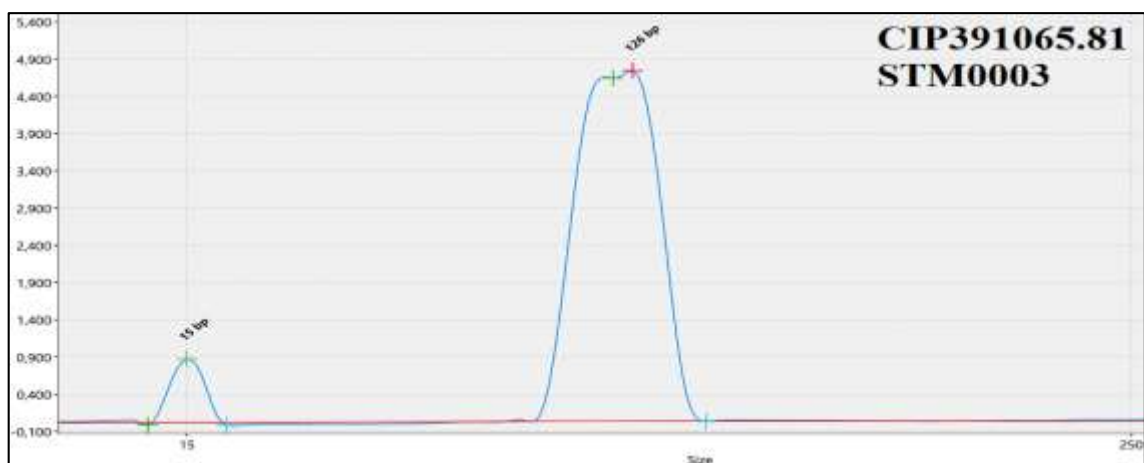


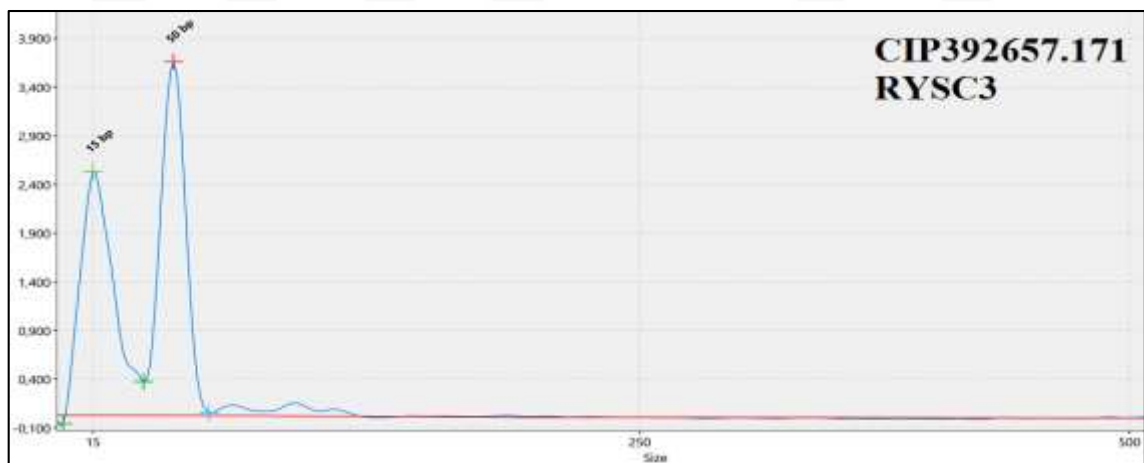
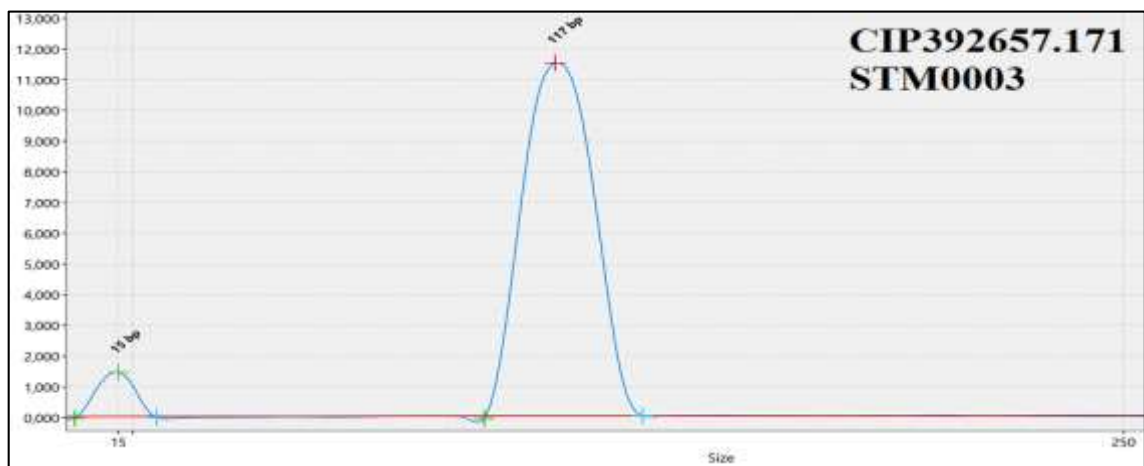
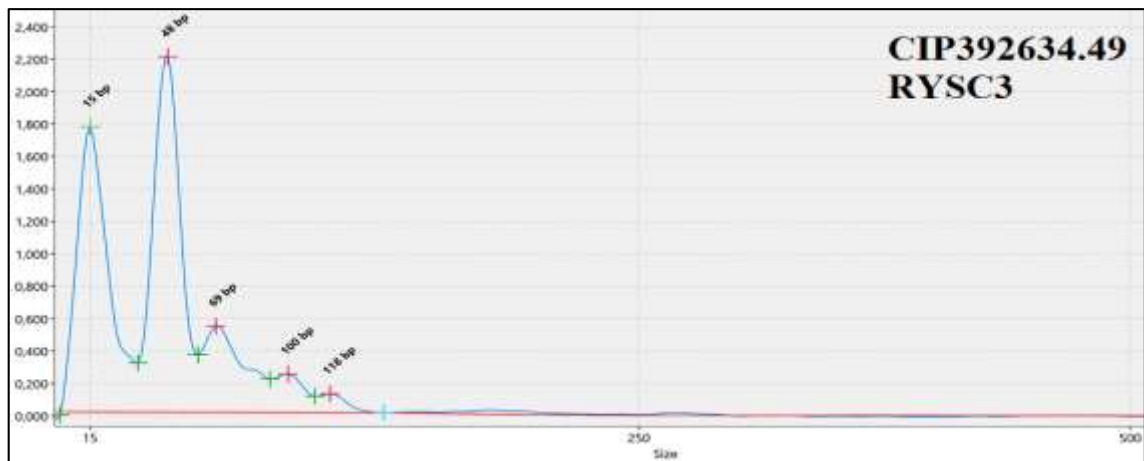


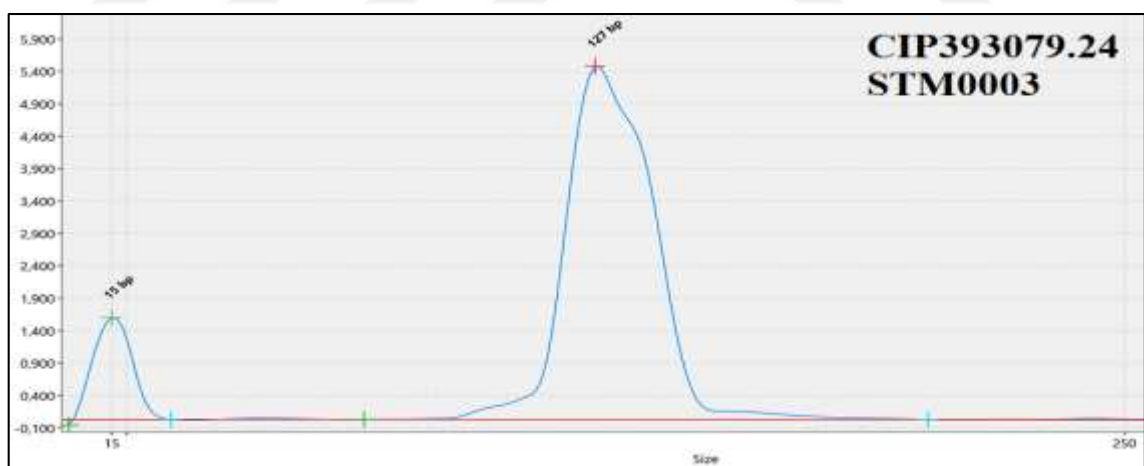
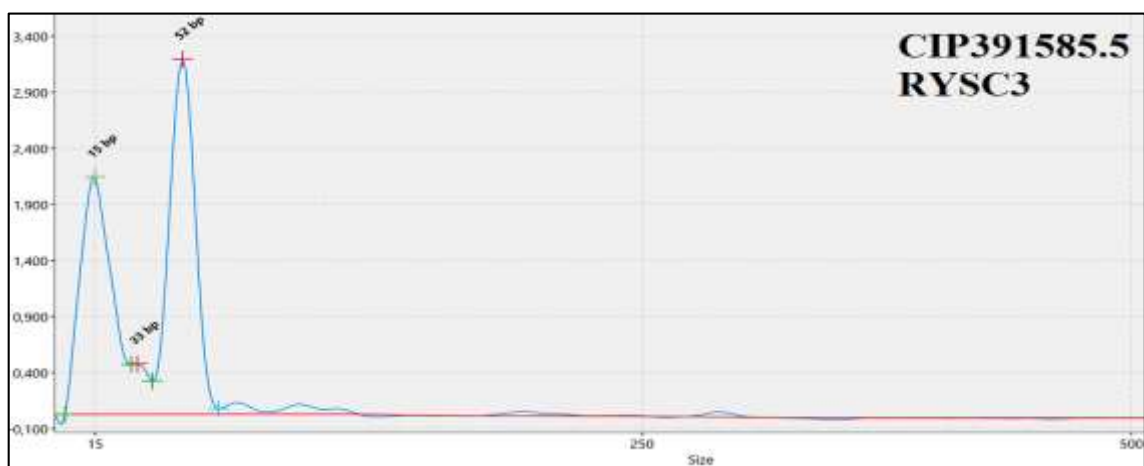
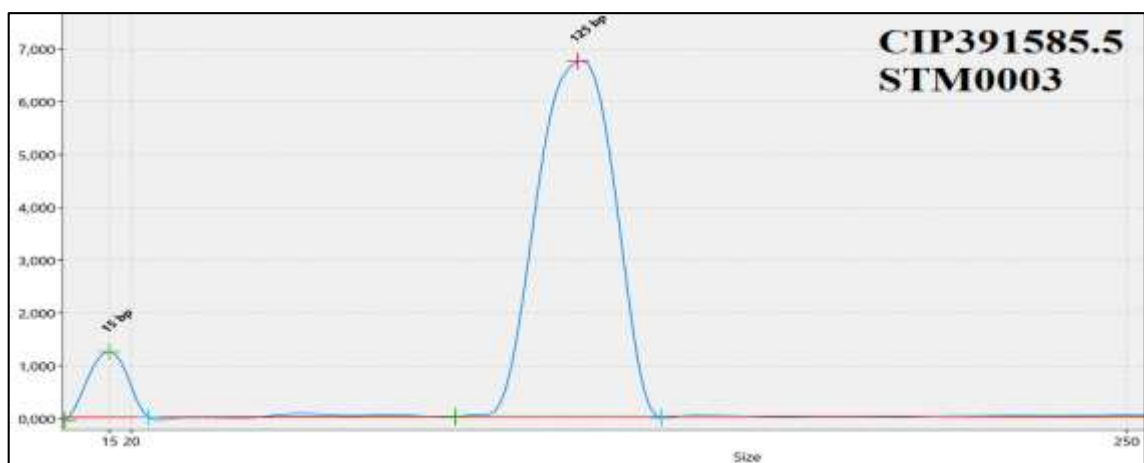


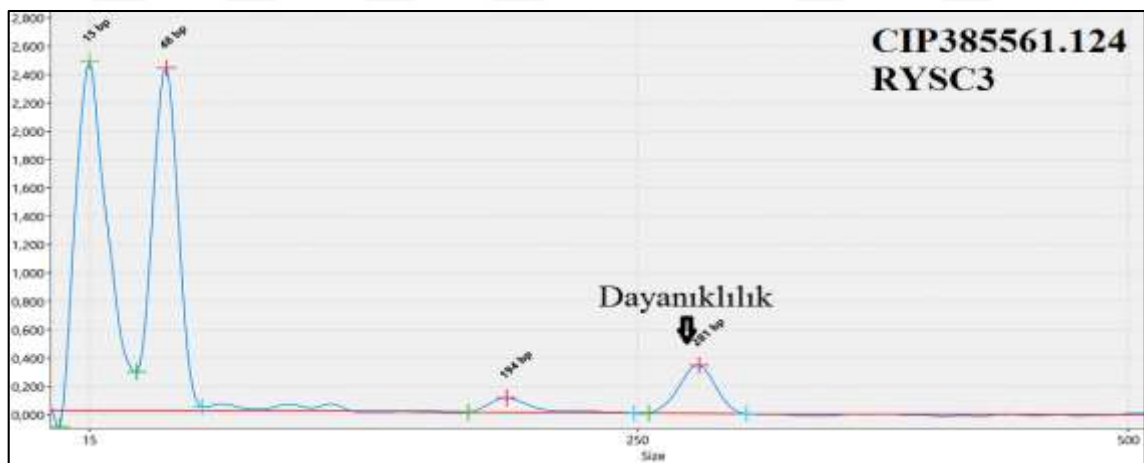
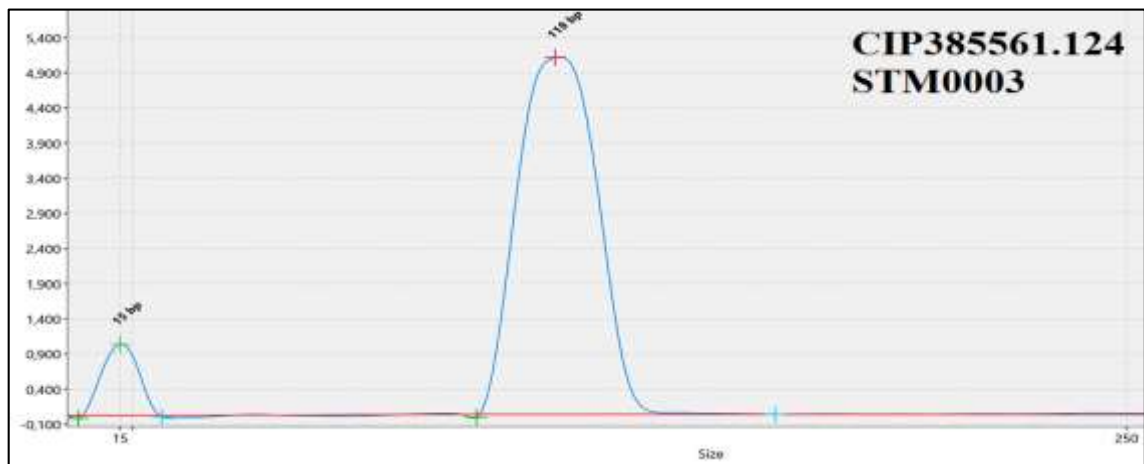
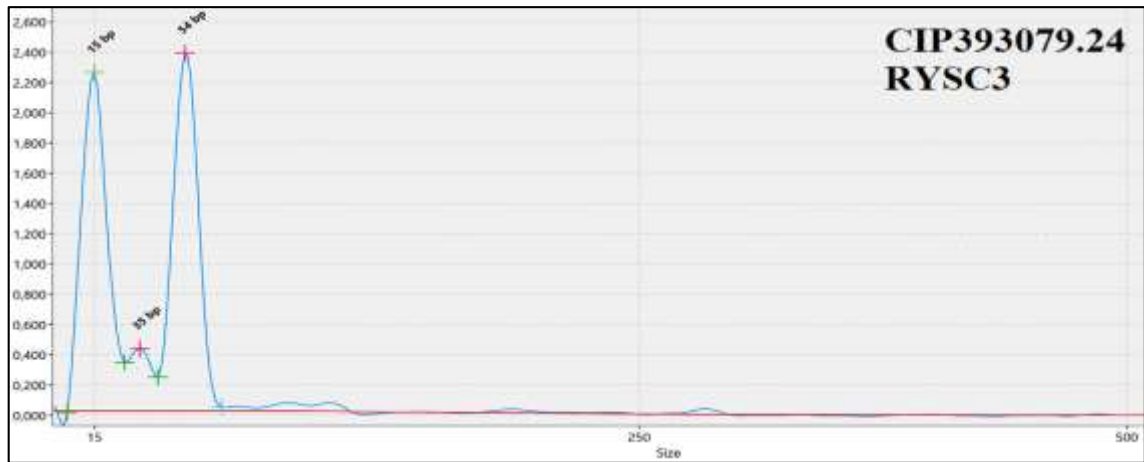


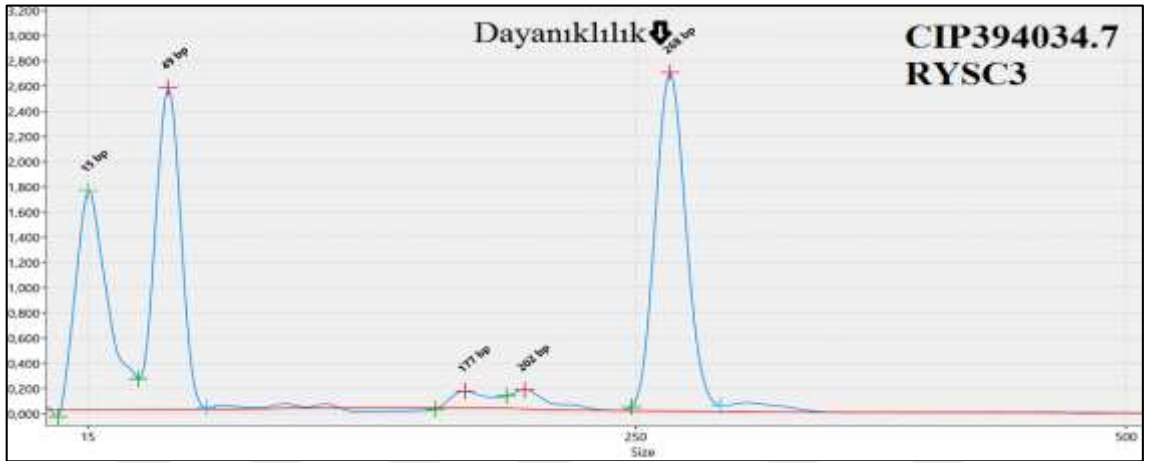
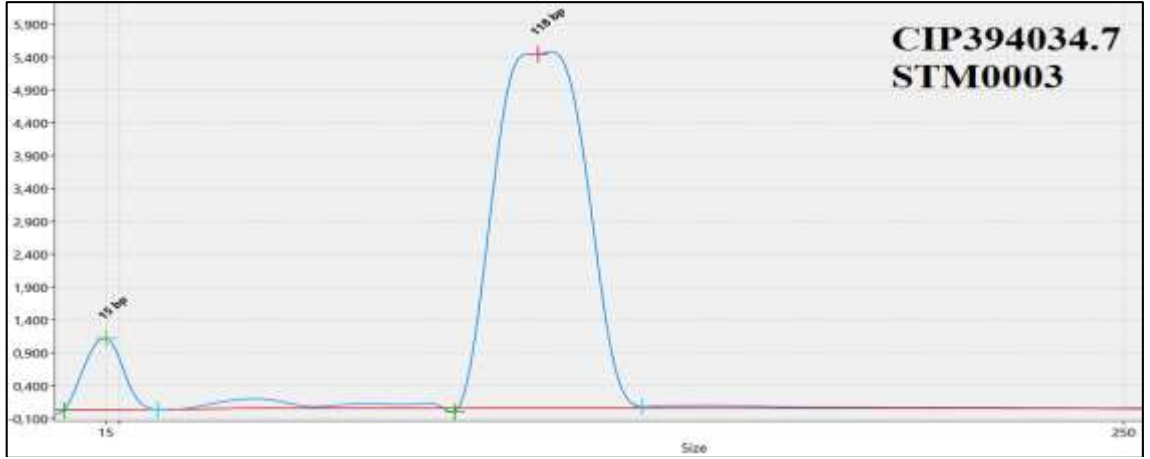












Y eksen: Oransal ışıma miktarı **X eksen:** Baz çifti uzunluğu (bp)

Şekil 4.8. Dayanıklı ve hassas çeşitlerle markör kontrol amaçlı yapılan PCR ürünleri Qiagen Qiaxcel Advanced cihazında analiz görüntüleri

Çizelge 4.2. Dayanıklı ve hassas çeşitlerle yapılan çalışmanın elektroforez jel ve Qiaxcel Advanced cihazı analiz sonuçları

		Jel sonuçları			Qiaxcel sonuçları			
	Örnek adı	PVY dirençlilik durumu	STM0003 Primeri	RYSC3 Primeri	Genel Dayanıklılık	STM0003 Primeri	RYSC3 Primeri	Genel Dayanıklılık
1	06-62	D	1	0	D	1	0	D
2	Alegria	D	0	0	H	0	0	H
3	Demon	D	1	0	D	1	0	D
4	Hermes	D	0	1	D	0	1	D
5	CIP-43	D	0	1	D	0	1	D
6	White lady	D	1	0	D	1	0	D
7	CIP398098-205	D	0	0	H	0	0	H
8	CIP396285-1	D	0	1	D	0	1	D
9	CIP394611-112	D	1	0	D	1	0	D
10	CIP397036-7	H	0	0	H	0	0	H
11	CIP390663-08	H	0	1	D	0	1	D
12	CIP391065-81	H	0	0	H	0	0	H
13	CIP392634-49	H	0	0	H	0	0	H
14	CIP392657-171	H	0	0	H	0	0	H
15	CIP391585-5	H	0	0	H	0	0	H
16	CIP393079-24	H	0	0	H	0	0	H
17	CIP385561-124	H	0	1	D	0	1	D
18	CIP394034-7	H	0	1	D	0	1	D

D: Dayanıklı **H:** Hassa

4.3 PCR Koşullarında Taranan Islah Hatlarının Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Yaptığımız çalışmada, 435 patates ıslah hattı PVY'ye dayanıklılık bakımından taranmıştır. Dayanıklılığın taranması için RYSC3 ve STM0003 isimli iki seleksiyon markörü kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen PCR ürünleri kapiler elektroforez cihazında analiz edilmiştir. Analiz sonuçları Çizelge 4.3, EK-A ve EK-B'de sunulmuştur.

Analiz sonuçlarında Ry_{sto} geni ile bağlantılı olan STM0003 markörünü içeren ıslah hatları 1 ile gösterilirken, ilgili markörü barındırmayan ıslah hatları 0 ile ifade

edilmiştir. Aynı şekilde Ry_{adg} geni ile bağlantılı olan RYSC3 markörü bulunan ıslah hatları 1 ile bulunmayanlar ise 0 ile gösterilmiştir. PVY virüsüne karşı dayanıklılık, patatest dominant tek gen tarafından kontrol edilmektedir (Simko ve ark., 2007; Mori ve ark., 2012). Ry_{sto} veya Ry_{adg} genlerinden sadece bir tanesine veya her ikisine birden sahip olan patates genotipleri PVY'ye dayanıklılık göstermektedir. Böylece, her iki markör için genel dayanıklılığa bakıldığı zaman STM0003 veya RYSC3 markörlerinden en az birisine sahip olan ıslah hatları dayanıklı olarak değerlendirilmiştir. Çizelge 4.4'de dayanıklı ıslah hatları D harfi ile hassas hatlar ise H harfi ile gösterilmiştir.

STM0003 markörü ile yapılan tarama sonucuna göre 146 ıslah hattının Ry_{sto} geni bakımından dayanıklılığa sahip olduğu 227 hattın ise Ry_{sto} ile bağlantılı STM0003 markörünü barındırmadığı belirlenmiştir. 62 ıslah hattında ise skrolama yapabilecek sonuç alınamamıştır. RYSC3 markörü ile yapılan tarama sonucunda 37 ıslah hattında Ry_{adg} kaynaklı dayanıklılık belirlenirken, 398 hatta Ry_{adg} genine bağlı RYSC3 markörü bulunmadığı tespit edilmiştir. STM0003 ve RYSC3 markörleri ile yapılan tarama sonuçları bir arada değerlendirildiğine, 168 ıslah hattının PVY'ye dayanıklı, 208 ıslah hattının ise hassas olduğu belirlenmiştir. Ayrıca rastlantısal olarak tekerrürlü olarak alınan ıslah hatlarının sonuçları da bir biriyle karşılaştırılmıştır. STM0003 markörü ile tekerrürlü olarak taranan 3 ıslah hattından birebir aynı sonuçlar elde edilmiştir. RYSC3 markörü ile 6 ıslah hattı tekerrürlü olarak taranmış ve 5 ıslah hattından aynı sonuçlar elde edilirken, bir ıslah hattı farklı sonuç vermiştir.

Çizelge 4.3. Islah hatlarının STM0003 ve RYSC3 primerleri ile PCR ürünlerinin Kapiler elektroforez cihazında analiz sonuçları

Örnek adı	STM0003	RYSC3	Dayanıklılık	Örnek adı	STM0003	RYSC3	Dayanıklılık
DT12103-14	1	0	D	DT12103-49	1	0	D
DT12111-1	0	0	H	DT12098-10	1	0	D
DT12104-3	0	0	H	DT12093-9	-	0	X
DT1204-14	1	0	D	DT12090-5	1	0	D
DT1203-55	1	0	D	DT12093-4	1	0	D
DT12103-65	0	0	H	DT12103-15	1	0	D
DT12104-10	0	0	H	DT12093-1	1	0	D
DT12104-5	0	0	H	DT12101-8	0	0	H
DT12101-5	0	0	H	DT1202-14	-	0	X
DT12109.2	0	0	H	DT12103-24	0	0	H
DT12103-8	0	0	H	DT12103-32	-	0	X

Çizelge 4.3 Devam							
DT12101-2	0	0	H	DT12102-9	0	0	H
DT12103-8	0	0	H	DT12103-1	1	0	D
DT12103-58	0	0	H	DT12103-20	1	0	D
DT1203-4	1	0	D	DT12098-8	-	0	X
DT12104-4	0	0	H	DT12103-22	-	0	X
DT12107-5	0	0	H	DT12103-48	1	0	D
DT12103-67	0	0	H	DT12095-3	0	0	H
DT1203-66	1	1	D	DT12103-41	-	0	X
DT12106-3	1	0	D	DT12103-46	0	0	H
DT12107-8	1	0	D	DT12103-39	1	0	D
DT12104-13	0	0	H	DT12093-7	0	0	H
DT12111-3	0	0	H	DT12093-8	-	1	D
DT12103-47	1	0	D	DT12103-44	0	0	H
DT12107-11	-	0	X	DT12103-43	0	0	H
DT12107-2	0	0	H	DT12094-2	-	0	X
DT12107-15	1	0	D	DT12078-42	0	0	H
DT12101-1	1	1	D	DT12091-4	0	0	H
DT12103-18	0	0	H	DT12078-35	1	0	D
DT12098-7	0	0	H	DT12078-29	0	0	H
DT12098-9	0	0	H	DT12062-39	0	0	H
DT12103-61	1	0	D	DT12078-22	-	0	X
DT12101-6	0	0	H	DT12084-2	-	0	X
DT12082-3	0	0	H	DT12062-42	-	0	X
DT1208-2	0	0	H	DT12072-1	1	0	D
DT12079-2	0	0	H	DT12084-9	0	0	H
DT1203-68	1	0	D	DT12072-11	0	0	H
DT12103-63	1	0	D	DT12097-3	-	0	X
DT12104-2	1	0	D	DT12062-18	-	0	X
DT12103-17	0	0	H	DT12077-5	0	0	H
DT12107-3	0	0	H	DT12065-16	0	0	H
DT12103-5	1	0	D	DT12093-6	1	0	D
DT12103-12	-	0	X	DT12090-1	0	0	H
DT12078-22	0	0	H	DT12084-11	1	0	D
DT12100-11	1	0	D	DT12098-5	0	0	H
DT12078-24	1	0	D	DT12062-38	0	1	D
DT12093-1	1	0	D	DT12062-49	0	0	H
DT12090-3	-	1	D	DT12065-6	0	0	H
DT12078-28	-	0	X	DT12078-47	0	0	H
DT12084-8	0	0	H	DT12084-1	0	0	H
DT12062-50	1	0	D	DT12082-4	-	0	X

Çizelge 4.3 Devam							
DT12088-2	1	0	D	DT12078-41	-	0	X
DT12078-16	0	0	H	DT12078-37	-	0	X
MOR	0	0	H	DT12077-2	0	0	H
DT12078-17	0	0	H	DT11036-1	0	0	H
DT11032-1	1	0	D	DT11052-2	1	0	D
DT11007-1	0	0	H	DT11039-1	0	0	H
DT11007-3	1	0	D	DT11044-1	-	0	X
DT11017-1	1	0	D	DT11036-3	1	0	D
DT12070-13	0	0	H	DT11036-2	0	0	H
DT11010-2	-	0	X	DT11017-4	1	0	D
DT12065-18	1	0	D	MEÇ-19	1	0	D
DT12065-9	1	0	D	DT11036-7	1	0	D
DT12065-8	-	0	X	DT11046-1	1	0	D
DT12064-6	0	1	D	DT11024-1	1	0	D
DT12065-1	1	0	D	DT11009-1	-	0	X
DT12097-6	-	0	X	DT11024-2	0	0	H
DT12078-25	0	0	H	DT12062-20	1	0	D
DT12091-2	0	0	H	DT11024-1	-	0	X
DT12078-48	0	0	H	DT11044-2	-	0	X
DT12062-29	0	0	H	DT12070-12	1	0	D
DT12078-21	0	0	H	DT12062-19	-	0	X
DT12072-7	1	0	D	DT12064-3	1	0	D
DT12079-1	0	0	H	DT11049-1	0	0	H
DT12079-1	0	0	H	DT12064-1	-	0	X
DT12084-5	-	0	X	DT11098-2	0	0	H
DT12078-23	0	0	H	DT12004-2	0	0	H
DT12084-3	0	0	H	DT12001-7	0	0	H
DT12065-2	0	0	H	DT12001-15	-	0	X
DT12065-5	0	0	H	DT12065-19	1	0	D
DT11103-5	1	0	D	DT11103-7	1	0	D
DT12077-6	-	0	X	DT12078-14	-	0	X
DT12065-15	1	0	D	DT12078-12	0	0	H
DT12072-9	1	0	D	DT11098-1	1	0	D
DT12078-3	-	0	X	DT11044-4	1	0	D
DT12071-1	0	0	H	DT12078-6	0	0	H
DT12062-24	1	0	D	DT11044-3	0	0	H
DT12063-1	1	0	D	DT11094-1	0	0	H
DT12078-36	0	0	H	DT12073-5	0	0	H
DT12072-3	0	1	D	DT11065-2	0	0	H
DT12062-26	1	0	D	DT12001-2	-	0	X

Çizelge 4.3 Devam							
DT12065-7	1	0	D	DT12068-5	0	0	H
DT12078-46	0	0	H	DT12065-25	0	0	H
DT12065-4	1	0	D	DT12001-21	0	0	H
DT11108-1	0	0	H	DT12068-27	1	0	D
DT12001-17	0	0	H	DT12004-3	0	1	D
MEÇ-20	-	0	X	DT12007-6	0	0	H
DT12065-22	0	0	H	DT11036-5	1	0	D
DT12001-14	0	0	H	DT11042-2	0	0	H
DT11042-4	1	0	D	DT11039-2	1	0	D
DT12065-23	0	0	H	DT12043-10	0	0	H
DT11102-2	0	1	D	DT12043-5	-	0	X
DT11107-1	0	0	H	DT11039-3	0	0	H
DT11049-3	-	0	X	DT12045-3	0	0	H
DT12065-21	1	0	D	DT12037-13	0	0	H
DT11068-1	0	0	H	DT12039-2	1	0	D
DT11103-1	-	0	X	DT12068-20	0	0	H
DT12068-17	1	0	D	DT12066-15	1	0	D
DT12004-1	0	0	H	DT12065-10	1	0	D
DT11052-1	-	0	X	DT12062-21	0	0	H
DT11066-1	1	0	D	DT11079-1	0	0	H
DT11084-1	0	0	H	DT12066-16	-	0	X
DT12007-5	-	0	X	DT12037-18	0	0	H
DT120661-25	-	0	X	DT12066-24	1	0	D
DT11066-2	1	0	D	DT12066-10	0	0	H
DT11079-2	1	0	D	DT12043-2	0	0	H
DT12006-4	0	0	H	DT12067-8	0	0	H
DT11103-3	1	0	D	DT12036-6	0	1	D
DT11088-1	0	0	H	DT12066-20	0	1	D
MEÇ-14	0	0	H	DT12066-2	0	0	H
DT12037-21	1	0	D	DT11078-1	0	0	H
DT12038-5	0	0	H	DT12065-3	1	1	D
DT11102-1	0	0	H	DT12039-3	0	1	D
DT11102-3	1	1	D	DT12037-6	0	0	H
DT12042-4	0	0	H	DT12037-20	0	0	H
DT11081-1	0	0	H	DT12037-2	0	0	H
MEÇ-17	0	1	D	DT11055-2	0	0	H
DT12006-6	0	0	H	DT11068-4	0	0	H
DT11036-4	1	0	D	DT12005-1	-	0	X
DT12066-4	0	0	H	DT12012-3	0	0	H
DT12065-13	1	0	D	DT12012-13	0	0	H

Çizelge 4.3 Devam							
DT12006-2	0	0	H	DT12001-18	0	0	H
DT12068-23	0	0	H	DT12012-31	0	0	H
DT12068-3	0	0	H	DT12038-1	0	0	H
DT12001-6	0	0	H	DT12013-1	1	0	D
DT12068-26	1	0	D	DT12034-3	1	1	D
DT12065-12	1	0	D	DT12012-10	1	0	D
DT12069-1	-	0	X	DT12012-20	0	0	H
DT12001-52	0	0	H	DT12043-4	0	0	H
DT12068-30	1	0	D	DT12012-22	0	0	H
B-102	1	0	D	DT12049-11	-	0	X
DT12037-11	0	0	H	DT12069-5	1	0	D
DT11057-1	0	0	H	DT12069-11	1	0	D
DT12043-17	1	0	D	DT12011-3	0	0	H
DT12007-11	1	0	D	DT12012-9	0	1	D
DT12032-5	1	0	D	DT12009-2	0	0	H
DT12045-16	0	0	H	DT12007-62	0	1	D
DT12046-7	1	0	D	DT12007-19	-	0	X
DT12049-15	0	0	H	DT12012-30	0	0	H
DT12013-18	0	0	H	DT12013-23	0	0	H
DT12027-2	0	0	H	DT12012-18	0	0	H
DT12017-2	0	0	H	DT12012-2	1	0	D
DT12032-35	0	0	H	DT12070-7	0	0	H
DT12032-6	0	0	H	DT12007-18	0	0	H
DT12011-1	0	0	H	DT12007-44	0	0	H
DT12055-6	-	0	X	DT12009-7	0	0	H
DT12032-29	0	1	D	DT12007-61	0	0	H
DT12012-24	0	0	H	DT12070-10	0	0	H
DT12032-14	0	0	H	DT12009-10	-	0	X
DT12007-23	0	0	H	DT12009-1	0	0	H
DT12012-11	0	0	H	DT12049-45	1	0	D
DT12036-17	0	0	H	DT12045-6	1	1	D
DT12007-53	1	1	D	DT12049-69	0	1	D
DT12007-21	0	0	H	DT12049-39	1	0	D
DT12007-27	1	0	D	DT12049-10	0	0	H
DT12007-25	0	0	H	DT12049-48	-	0	X
DT12007-28	1	0	D	DT12013-12	0	0	H
DT12007-58	1	0	D	DT12017-1	0	1	D
DT12049-51	1	0	D	DT12012-14	1	0	D
DT12007-51	-	0	X	DT12013-16	0	0	H
DT12007-43	0	0	H	DT12046-8	1	0	D

Çizelge 4.3 Devam							
DT12007-29	0	0	H	DT12017-6	1	0	D
DT12010-4	0	1	D	DT12024-3	1	0	D
DT12014-4	-	0	X	DT12049-69	-	0	X
DT12009-6	1	1	D	DT12045-11	0	0	H
DT12009-14	0	0	H	DT12015-4	1	0	D
DT12007-64	0	0	H	DT12069-18	0	0	H
DT12009-5	0	0	H	DT12070-11	1	0	D
DT12014-1	0	0	H	DT12049-56	1	1	D
DT12009-12	1	0	D	DT12049-69	0	0	H
DT12007-63	1	0	D	DT12049-59	1	0	D
DT12007-60	0	0	H	DT12055-9	1	0	D
DT12069-2	0	0	H	DT12049-33	1	0	D
DT12007-47	1	1	D	DT12055-3	0	0	H
DT12012-26	0	0	H	DT12049-70	0	0	H
DT12007-46	1	0	D	DT12049-21	0	0	H
DT12007-30	1	0	D	DT12049-16	0	0	H
DT12007-15	1	0	D	DT12049-30	1	0	D
DT12022-5	0	0	H	DT12061-14	0	0	H
DT12034-24	1	1	D	DT12062-9	1	0	D
DT12032-45	0	0	H	DT12062-15	0	1	D
DT12034-16	0	1	D	DT12016-4	0	1	D
DT12013-21	0	0	H	DT12014-3	0	0	H
DT12037-1	0	0	H	DT12061-6	0	0	H
DT12034-23	1	1	D	DT12061-8	0	0	H
DT12022-1	1	0	D	DT12042-8	-	0	X
DT12057-6	1	1	D	DT12053-9	0	1	D
DT12032-15	1	0	D	DT12055-2	-	0	X
DT12031-1	0	0	H	DT12042-6	0	0	H
DT12032-4	1	1	D	DT12037-22	-	0	X
DT12035-2	1	0	D	DT12039-6	1	0	D
DT12034-25	-	0	X	DT12042-7	0	0	H
DT12034-27	1	0	D	DT12061-1	1	0	D
DT12024-2	0	0	H	DT12055-12	-	0	X
DT12015-2	0	0	H	DT12057-2	-	0	X
DT12015-3	0	0	H	DT12034-6	-	0	X
DT12061-19	1	0	D	DT12036-9	-	0	X
DT12061-24	0	0	H	DT12069-8	0	0	H
DT12062-1	0	0	H	DT12070-2	1	0	D
DT12062-16	1	0	D	DT12070-3	1	0	D
DT12057-9	1	0	D	DT12014-2	1	0	D

Çizelge 4.3 Devam							
DT12057-13	1	0	D	DT12052-3	-	0	X
DT12032-47	0	1	D	DT12070-4	0	0	H
DT12015-11	1	0	D	DT12049-54	1	0	D
DT12060-2	-	0	X	DT12052-7	1	1	D
DT12017-4	0	0	H	DT12057-5	1	0	D
DT12057-8	0	0	H	DT12031-2	0	0	H
DT12017-3	0	0	H	DT12036-10	1	0	D
DT12013-22	0	0	H	DT12036-11	1	0	D
DT12013-14	1	0	D	DT12032-49	0	0	H
DT12013-5	-	0	X	DT12036-15	-	0	X

Çizelge 4.4. Sonuçlara göre dayanıklılık geni içeren ıslah hatları

Örnek adı	STM0003	RYSC3	Dayanıklılık	Örnek adı	STM0003	RYSC3	Dayanıklılık
DT12103-14	1	0	D	DT12068-27	1	0	D
DT1204-14	1	0	D	DT12004-3	0	1	D
DT1203-55	1	0	D	DT11036-5	1	0	D
DT1203-4	1	0	D	DT11039-2	1	0	D
DT1203-66	1	1	D	DT12039-2	1	0	D
DT12106-3	1	0	D	DT12066-15	1	0	D
DT12107-8	1	0	D	DT12065-10	1	0	D
DT12103-47	1	0	D	DT12066-24	1	0	D
DT12107-15	1	0	D	DT12036-6	0	1	D
DT12101-1	1	1	D	DT12066-20	0	1	D
DT12103-61	1	0	D	DT12065-3	1	1	D
DT1203-68	1	0	D	DT12039-3	0	1	D
DT12103-63	1	0	D	DT12013-1	1	0	D
DT12104-2	1	0	D	DT12034-3	1	1	D
DT12103-5	1	0	D	DT12012-10	1	0	D
DT12100-11	1	0	D	DT12043-17	1	0	D
DT12078-24	1	0	D	DT12007-11	1	0	D
DT12093-1	1	0	D	DT12032-5	1	0	D
DT12103-49	1	0	D	DT12046-7	1	0	D
DT12098-10	1	0	D	DT12032-29	0	1	D
DT12090-5	1	0	D	DT12007-53	1	1	D
DT12093-4	1	0	D	DT12007-27	1	0	D
DT12103-15	1	0	D	DT12007-28	1	0	D
DT12093-1	1	0	D	DT12007-58	1	0	D
DT12103-1	1	0	D	DT12049-51	1	0	D
DT12103-20	1	0	D	DT12010-4	0	1	D

Çizelge 4.4 Devam							
DT12103-48	1	0	D	DT12009-6	1	1	D
DT12103-39	1	0	D	DT12009-12	1	0	D
DT12093-8	-	1	D	DT12007-63	1	0	D
DT12078-35	1	0	D	DT12007-47	1	1	D
DT12072-1	1	0	D	DT12007-46	1	0	D
DT12093-6	1	0	D	DT12007-30	1	0	D
DT12084-11	1	0	D	DT12007-15	1	0	D
DT12062-38	0	1	D	DT12069-5	1	0	D
DT12090-3	-	1	D	DT12069-11	1	0	D
DT12062-50	1	0	D	DT12012-9	0	1	D
DT12088-2	1	0	D	DT12007-62	0	1	D
DT11032-1	1	0	D	DT12012-2	1	0	D
DT11007-3	1	0	D	DT12049-45	1	0	D
DT11017-1	1	0	D	DT12045-6	1	1	D
DT12065-18	1	0	D	DT12049-69	0	1	D
DT12065-9	1	0	D	DT12049-39	1	0	D
DT12064-6	0	1	D	DT12017-1	0	1	D
DT12065-1	1	0	D	DT12012-14	1	0	D
DT12072-7	1	0	D	DT12046-8	1	0	D
DT11103-5	1	0	D	DT12017-6	1	0	D
DT12065-15	1	0	D	DT12024-3	1	0	D
DT12072-9	1	0	D	DT12015-4	1	0	D
DT12062-24	1	0	D	DT12070-11	1	0	D
DT12063-1	1	0	D	DT12049-56	1	1	D
DT12072-3	0	1	D	DT12049-59	1	0	D
DT12062-26	1	0	D	DT12055-9	1	0	D
DT12065-7	1	0	D	DT12049-33	1	0	D
DT12065-4	1	0	D	DT12049-30	1	0	D
DT11052-2	1	0	D	DT12034-24	1	1	D
DT11036-3	1	0	D	DT12034-16	0	1	D
DT11017-4	1	0	D	DT12034-23	1	1	D
MEÇ-19	1	0	D	DT12022-1	1	0	D
DT11036-7	1	0	D	DT12057-6	1	1	D
DT11046-1	1	0	D	DT12032-15	1	0	D
DT11024-1	1	0	D	DT12032-4	1	1	D
DT12062-20	1	0	D	DT12035-2	1	0	D
DT12070-12	1	0	D	DT12034-27	1	0	D
DT12064-3	1	0	D	DT12061-19	1	0	D
DT12065-19	1	0	D	DT12062-16	1	0	D
DT11103-7	1	0	D	DT12057-9	1	0	D

Çizelge 4.4 Devam							
DT11098-1	1	0	D	DT12057-13	1	0	D
DT11044-4	1	0	D	DT12032-47	0	1	D
DT11042-4	1	0	D	DT12015-11	1	0	D
DT11102-2	0	1	D	DT12013-14	1	0	D
DT12065-21	1	0	D	DT12070-2	1	0	D
DT12068-17	1	0	D	DT12070-3	1	0	D
DT11066-1	1	0	D	DT12014-2	1	0	D
DT11066-2	1	0	D	DT12049-54	1	0	D
DT11079-2	1	0	D	DT12052-7	1	1	D
DT11103-3	1	0	D	DT12057-5	1	0	D
DT12037-21	1	0	D	DT12036-10	1	0	D
DT11102-3	1	1	D	DT12036-11	1	0	D
MEÇ-17	0	1	D	DT12062-9	1	0	D
DT11036-4	1	0	D	DT12062-15	0	1	D
DT12065-13	1	0	D	DT12016-4	0	1	D
DT12068-26	1	0	D	DT12053-9	0	1	D
DT12065-12	1	0	D	DT12039-6	1	0	D
DT12068-30	1	0	D	DT12061-1	1	0	D
B-102	1	0	D				

Çizelge 4.5. Sonuçlara göre hasas olarak belirlenen ıslah hatları

Örnek adı	STM0003	RYSC3	Dayanıklılık	Örnek adı	STM0003	RYSC3	Dayanıklılık
DT12111-1	0	0	H	DT12006-2	0	0	H
DT12104-3	0	0	H	DT12068-23	0	0	H
DT12103-65	0	0	H	DT12068-3	0	0	H
DT12104-10	0	0	H	DT12001-6	0	0	H
DT12104-5	0	0	H	DT12001-52	0	0	H
DT12101-5	0	0	H	DT12007-6	0	0	H
DT12109.2	0	0	H	DT11042-2	0	0	H
DT12103-8	0	0	H	DT12043-10	0	0	H
DT12101-2	0	0	H	DT11039-3	0	0	H
DT12103-8	0	0	H	DT12045-3	0	0	H
DT12103-58	0	0	H	DT12037-13	0	0	H
DT12104-4	0	0	H	DT12068-20	0	0	H
DT12107-5	0	0	H	DT12062-21	0	0	H
DT12103-67	0	0	H	DT11079-1	0	0	H
DT12104-13	0	0	H	DT12037-18	0	0	H
DT12111-3	0	0	H	DT12066-10	0	0	H
DT12107-2	0	0	H	DT12043-2	0	0	H

Çizelge 4.5 Devam							
DT12103-18	0	0	H	DT12067-8	0	0	H
DT12098-7	0	0	H	DT12066-2	0	0	H
DT12098-9	0	0	H	DT11078-1	0	0	H
DT12101-6	0	0	H	DT12037-6	0	0	H
DT12082-3	0	0	H	DT12037-20	0	0	H
DT1208-2	0	0	H	DT12037-2	0	0	H
DT12079-2	0	0	H	DT11055-2	0	0	H
DT12103-17	0	0	H	DT11068-4	0	0	H
DT12107-3	0	0	H	DT12012-3	0	0	H
DT12078-22	0	0	H	DT12012-13	0	0	H
DT12101-8	0	0	H	DT12001-18	0	0	H
DT12103-24	0	0	H	DT12012-31	0	0	H
DT12102-9	0	0	H	DT12038-1	0	0	H
DT12095-3	0	0	H	DT12012-20	0	0	H
DT12103-46	0	0	H	DT12043-4	0	0	H
DT12093-7	0	0	H	DT12012-22	0	0	H
DT12103-44	0	0	H	DT12037-11	0	0	H
DT12103-43	0	0	H	DT11057-1	0	0	H
DT12078-42	0	0	H	DT12045-16	0	0	H
DT12091-4	0	0	H	DT12049-15	0	0	H
DT12078-29	0	0	H	DT12013-18	0	0	H
DT12062-39	0	0	H	DT12027-2	0	0	H
DT12084-9	0	0	H	DT12017-2	0	0	H
DT12072-11	0	0	H	DT12032-35	0	0	H
DT12077-5	0	0	H	DT12032-6	0	0	H
DT12065-16	0	0	H	DT12011-1	0	0	H
DT12090-1	0	0	H	DT12012-24	0	0	H
DT12098-5	0	0	H	DT12032-14	0	0	H
DT12062-49	0	0	H	DT12007-23	0	0	H
DT12084-8	0	0	H	DT12012-11	0	0	H
DT12078-16	0	0	H	DT12036-17	0	0	H
MOR	0	0	H	DT12007-21	0	0	H
DT12078-17	0	0	H	DT12007-25	0	0	H
DT11007-1	0	0	H	DT12007-43	0	0	H
DT12070-13	0	0	H	DT12007-29	0	0	H
DT12078-25	0	0	H	DT12009-14	0	0	H
DT12091-2	0	0	H	DT12007-64	0	0	H
DT12078-48	0	0	H	DT12009-5	0	0	H
DT12062-29	0	0	H	DT12014-1	0	0	H
DT12078-21	0	0	H	DT12007-60	0	0	H

Çizelge 4.5 Devam							
DT12079-1	0	0	H	DT12069-2	0	0	H
DT12079-1	0	0	H	DT12012-26	0	0	H
DT12078-23	0	0	H	DT12011-3	0	0	H
DT12084-3	0	0	H	DT12009-2	0	0	H
DT12065-2	0	0	H	DT12012-30	0	0	H
DT12065-5	0	0	H	DT12013-23	0	0	H
DT12071-1	0	0	H	DT12012-18	0	0	H
DT12078-36	0	0	H	DT12070-7	0	0	H
DT12078-46	0	0	H	DT12007-18	0	0	H
DT12065-6	0	0	H	DT12007-44	0	0	H
DT12078-47	0	0	H	DT12009-7	0	0	H
DT12084-1	0	0	H	DT12007-61	0	0	H
DT12077-2	0	0	H	DT12070-10	0	0	H
DT11036-1	0	0	H	DT12009-1	0	0	H
DT11039-1	0	0	H	DT12049-10	0	0	H
DT11036-2	0	0	H	DT12013-12	0	0	H
DT11024-2	0	0	H	DT12013-16	0	0	H
DT11049-1	0	0	H	DT12045-11	0	0	H
DT11098-2	0	0	H	DT12069-18	0	0	H
DT12004-2	0	0	H	DT12049-69	0	0	H
DT12001-7	0	0	H	DT12055-3	0	0	H
DT12078-12	0	0	H	DT12049-70	0	0	H
DT12078-6	0	0	H	DT12049-21	0	0	H
DT11044-3	0	0	H	DT12049-16	0	0	H
DT11094-1	0	0	H	DT12022-5	0	0	H
DT12073-5	0	0	H	DT12032-45	0	0	H
DT11065-2	0	0	H	DT12013-21	0	0	H
DT12068-5	0	0	H	DT12037-1	0	0	H
DT12065-25	0	0	H	DT12031-1	0	0	H
DT12001-21	0	0	H	DT12024-2	0	0	H
DT11108-1	0	0	H	DT12015-2	0	0	H
DT12001-17	0	0	H	DT12015-3	0	0	H
DT12065-22	0	0	H	DT12061-24	0	0	H
DT12001-14	0	0	H	DT12062-1	0	0	H
DT12065-23	0	0	H	DT12017-4	0	0	H
DT11107-1	0	0	H	DT12057-8	0	0	H
DT11068-1	0	0	H	DT12017-3	0	0	H
DT12004-1	0	0	H	DT12013-22	0	0	H
DT11084-1	0	0	H	DT12069-8	0	0	H
DT12006-4	0	0	H	DT12070-4	0	0	H

Çizelge 4.5 Devam							
DT11088-1	0	0	H	DT12031-2	0	0	H
MEÇ-14	0	0	H	DT12032-49	0	0	H
DT12038-5	0	0	H	DT12061-14	0	0	H
DT11102-1	0	0	H	DT12014-3	0	0	H
DT12042-4	0	0	H	DT12061-6	0	0	H
DT11081-1	0	0	H	DT12061-8	0	0	H
DT12006-6	0	0	H	DT12042-6	0	0	H
DT12066-4	0	0	H	DT12042-7	0	0	H



BÖLÜM V

SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında esas amacımız moleküler markörler kullanılarak PVY'ye karşı dayanıklılık genlerini içeren ıslah hatlarının tespit edilmesidir. Bu nedenle, dayanıklı ve hassas olduğu bilinen 5 genotiple yapılan ön çalışmalar sonucuna göre ıslah hatlarında taramalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalara göre STM0003 ve RYSC3 seleksiyon markörlerinin patates ıslah hatlarında PVY'ye dayanıklılığın tespit edilmesi amacıyla kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Islah programı esnasında ıslah hatlarının moleküler markörler kullanılarak taranması sonucunda ıslah programı seleksiyon etkinliği artmakta ve iş gücü azalmaktadır. Örneğin yapılan ıslah çalışmasında patates Y virüsüne dayanıklılık üzerine bir seçim yapılacaksa gerçek tohum ekiminden sonra veya birinci tarla generasyonu döneminde moleküler markör ile seleksiyon yapılarak tarlada çalışılacak hat sayısı azaltılabilir.

Ayrıca yapılan ön çalışmada, PCR ürünleri jel elektroforez ve kapiler elektroforez yöntemleri ile analiz edilerek sonuçlar karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda kapiler elektroforez cihazının jel görüntüsünde tam belirlenemeyen çok zayıf bantları bile görüntüleyebildiği anlaşılmıştır. Bununla birlikte jel elektroforez ile sonuç almak için uzun zaman ve fazla iş gücü gerekmektedir. Ancak kapiler elektroforez cihazı ile daha kısa zamanda sonuç alınmaktadır ve bunun yanında 96 örneğin aynı anda analiz edilebildiği otomatik bir sistem olduğu için iş gücünden tasarruf sağlanmaktadır.

Patateste PVY'ye dayanıklılığın belirlenmesi için dayanıklılıkla ilişkili en az iki genin (Ry_{sto} ve Ry_{adg}) değerlendirilmesi gerekmektedir. Bir patates genotipinin PVY'ye dayanıklılık gösterebilmesi için bu iki genden en az bir tanesine sahip olması gerekmektedir. Tez kapsamında dayanıklı ve hassas olduğu bilinen genotiplerle yapılan çalışmada, Ry_{sto} genine bağlı STM0003 ve Ry_{adg} genine bağlı RYSC3 markörlerinden elde edilen sonuçların bir arada değerlendirilmesi sonucunda dayanıklı genotiplerin %78'inin doğru bir şekilde tespit edilebileceği gözlemlenmiştir. Bunun yanında hassas genotipler %67 oranında bir doğrulukla belirlenmiştir. Genel olarak, STM0003 ve RYSC3 markör sonuçları bir arada değerlendirildiğinde patates genotiplerinin PVY'ye dayanıklılık ve hassasiyet durumları % 72 doğruluk oranı ile belirlenmiştir.

STM0003 ve RYSC3 markörleri ile yapılan tarama sonucunda, tezkapsamında incelenen 435 adet ıslah hattının 168 tanesinin PVY'ye dayanıklı, 208 tanesinin ise hassas olduğu belirlenmiştir. Böylece, bir ıslah programında moleküler yardımcı seleksiyon yaklaşımıyla PVY'ye dayanıklı yeni patates çeşit adayları belirlenmiştir. Bununla birlikte, tez kapsamında kullanılan moleküler markörlerin Türkiye'de yürütülen patates ıslah programlarında kullanılabileceği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Türkiye'deki patates ıslah programlarında moleküler markörlerin kullanılmasının PVY'ye dayanıklı yeni çeşitlerin geliştirilmesini kolaylaştıracağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, STM0003 ve RYSC3 markörlerinin patates ıslah programına entegre edilmesi durumunda, PVY'dayanıklı hatların çok önemli bir kısmı programın erken dönemlerinde belirlenebilecektir. Bu durum, ıslah programının ileri aşamalarına daha az sayıda ıslah hattının taşınmasına, böylece alandan, iş gücünden ve diğer girdi maliyetlerinden tasarruf edilmesine yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

Agarwal, M., Shrivastava, N. and Padh, H., "Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences", ***Plant Cell Reports*** 27(4), 617-631, 2008.

Agrios, G. N., Plant Diseases Caused by Viruses, Plant Pathology, ***Academic Press***, California, USA, 1997.

Akınerdem, F. ve Öztürk, Ö., Nişasta-Şeker Yetiştiriciliği Ders Notları, ***Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü***, Konya, 2005.

Arioğlu, H., Çalışkan, M. E. ve Onaran, H., "Türkiye’de Patates Üretimi Sorunları ve Çözüm Önerileri", ***IV. Ulusal Patates Kongresi***, Niğde, 06-08 Eylül, 2006.

Arnedo-Andrés, M. S., Luis-Arteaga, M. and Ortega, R. G., "New inheritance studies related to Potato Virus Y (PVY) resistance in *Capsicum annuum* L. ‘Serrano Criollo de Morelos-334’", ***Euphytica*** 151(1), 95-101, 2006.

Avila, A. C., Salazar, L. F., Hidalgo, O. A., Nakashima, J. and Dusi, A. N., "Serological techniques and antiserum production", ***International Potato Center*** 17(1), 1-8, 1989.

Bakker, E., Borm, T., Prins, P., van der Vossen, E., Uenk, G., Arens, M., de Boer, J., van Eck, H., Muskens, M. and Vossen, J., "A genome-wide genetic map of NB-LRR disease resistance loci in potato", ***Theoretical and Applied Genetics*** 123(3), 493-508, 2011.

Ballvora, A., Hesselbach, J., Niewöhner, J., Leister, D., Salamini, F. and Gebhardt, C., "Marker enrichment and high-resolution map of the segment of potato chromosome VII harbouring the nematode resistance gene Gro1", ***Molecular and General Genetics MGG*** 249(1), 82-90, 1995.

Barker, H., "Extreme resistance to potato virus V in clones of *Solanum tuberosum* that are also resistant to potato viruses Y and A: evidence for a locus conferring broad-spectrum potyvirus resistance", *Theoretical and Applied Genetics* 95(8), 1258-1262, 1997.

Barker, H. and Harrison, B. D., "Expression of genes for resistance to potato virus Y in potato plants and protoplasts", *Annals of Applied Biology* 105(3), 539-545, 1984.

Beczner, L., Horváth, J., Romhányi, I. and Förster, H., "Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato", *Potato Research* 27(3), 339-352, 1984.

Bilgin, O. ve Korkut, K. Z., "Bazı ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşit ve hatlarının genetik uzaklıklarının belirlenmesi", *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi* 2(3), 245-252, 2005.

Boonham, N. and Barker, I., "Strain specific recombinant antibodies to potato virus Y potyvirus", *Journal of Virological Methods* 74(2), 193-199, 1998.

Bostan, H. ve Demirci, E., "Patates X ve Y virüslerinin bazı patates çeşitlerinde neden olduğu semptomlar/the symptoms caused by potato virus x (pvx) and potato virüs y (pvy) on some potato cultivars", *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 32(1), 1-4, 2011.

Bostan, H. and Haliloglu, K., "Distribution of PLRV, PVS, PVX and PVY (PVYN, PVYo and PVYc) in the seed potato tubers in Turkey", *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7(7), 1140-1143, 2004.

Bostan, H., Nie, X. and Singh, R. P., "An RT-PCR primer pair for the detection of Pospiviroid and its application in surveying ornamental plants for viroids", *Journal of Virological Methods* 116(2), 189-193, 2004.

Bradshaw, J. E., Hackett, C. A., Meyer, R. C., Milbourne, D., McNicol, J. W., Phillips, M. S. and Waugh, R., "Identification of AFLP and SSR markers associated with quantitative resistance to *Globodera pallida* (Stone) in tetraploid potato (*Solanum*

tuberosum subsp. *tuberosum*) with a view to marker-assisted selection", ***Theoretical and Applied Genetics*** 97(1-2), 202-210, 1998.

Brunt, A., Crabtree, K. and Gibbs, A., Viruses of Tropical Plants, ***C.A.B. International***, Wallington, Oxon, United Kingdom, 1990.

Brunt, A. A., The main viruses infecting potato crops, In: Virus and Virus-Like Diseases of Potatoes and Production of Seed-Potatoes, ***Kluwer Academic Publishers***, Dordrecht, 2001.

Caromel, B., Mugniéry, D., Kerlan, M.-C., Andrzejewski, S., Palloix, A., Ellissèche, D., Rousselle-Bourgeois, F. and Lefebvre, V., "Resistance quantitative trait loci originating from *Solanum sparsipilum* act independently on the sex ratio of *Globodera pallida* and together for developing a necrotic reaction", ***Molecular Plant-Microbe Interactions*** 18(11), 1186-1194, 2005.

Cernák, I., Taller, J., Wolf, I., Fehér, E., Babinszky, G., Alföldi, Z., Csanádi, G. and Polgár, Z., "Analysis of the applicability of molecular markers linked to the PVY extreme resistance gene Ry^{sto} , and the identification of new markers", ***Acta Biologica Hungarica*** 59(2), 195-203, 2008.

De Bokx, J. A. and Huttinga, H., Potato virus Y, Descriptions of plant viruses, <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=414>, 1981.

Delgado-Sanchez, S. and Grogan, R. G., Potato Virus YCMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=242>, 1970.

Devran, Z., "Moleküler işaretleyicilerin dayanıklılık ıslahında kullanılması", ***Derim*** 20(1), 1-6, 2016.

Doyle, J., DNA Protocols for Plants, In: Molecular Techniques in Taxonomy, ***Springer***, Netherland, 1991.

Elçi, Ş., Tarla Bitkileri Ders Kitabı, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Ankara, 1994.

Er, C. ve Uranbey, S., Nişasta ve Şeker Bitkileri, *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi*, Ankara, 2009.

Esendal, E., Nişasta Şeker Bitkileri ve Islahı, *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları*, Samsun, 1990.

Flis, B., Henning, J., Strelczyk-Zyta, D., Gebhardt, C. and Marczewski, W., "The Ry-Fsto gene from *Solanum stoloniferum* for extreme resistance to potato virus Y maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker Gp122718 In pvy resistant cultivars", *Molecular Breeding* 15, 95-101, 2005.

Gebhardt, C., Bellin, D., Henselewski, H., Lehmann, W., Schwarzfischer, J. and Valkonen, J. P. T., "Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato", *Theoretical and Applied Genetics* 112(8), 1458-1464, 2006.

Gebhardt, C. and Valkonen, J. P. T., "Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome", *Annual Review of Phytopathology* 39(1), 79-102, 2001.

Gray, S., De Boer, S., Lorenzen, J., Karasev, A., Whitworth, J., Nolte, P., Singh, R., Boucher, A. and Xu, H., "Potato virus Y: an evolving concern for potato crops in the United States and Canada", *Plant Disease* 94(12), 1384-1397, 2010.

Gupta, P. K. and Rustgi, S., "Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants", *Functional & Integrative Genomics* 4(3), 139-162, 2004.

Güner, Ü. ve Yorgancı, Ü., "Afyon ve Bolu İllerinde patateslerdeki Virüs Hastalıklarının Tanılanması ve Hastalık Oranları", *Türkiye 3. Bitki Koruma Kongresi*, Van, 15-18 Temmuz, 2009.

Hämäläinen, J. H., Watanabe, K. N., Valkonen, J. P. T., Arihara, A., Plaisted, R. L., Pehu, E., Miller, L. and Slack, S. A., "Mapping and marker-assisted selection for a gene for extreme resistance to potato virus Y", *Theoretical and Applied Genetics* 94(2), 192-197, 1997.

Hawkes, J. G., The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources, **Belhaven Press**, London, UK, 1990.

Heldák, J., Bežo, M., ŠtefúnoVá, V. and GAllikoVá, A., "Selection of DNA markers for detection of extreme resistance to potato virus Y in tetraploid potato", *Czech J. Genet. Plant Breed* 43(4), 125-134, 2007.

Hooker, W. J., Compendium of Potato Diseases, **American Phytopathological Society Press**, Minnesota, USA, 1986.

Ilisulu, K., "Potato industry in Turkey", *American Journal of Potato Research* 34(4), 97-105, 1957.

Jones, E. D., "A current assessment of in vitro culture and other rapid multiplication methods in North America and Europe", *American Potato Journal* 65(4), 209-220, 1988.

Jones, R., Kumar, S. and Mackie, A., Potato Virus Y, www.agric.wa.gov.au/pls/portal30/docs/FOLDER/IKMP/PW/PH/DIS/FS00 203.PDF, 2003.

Kasai, K., Morikawa, Y., Sorri, V., Valkonen, J. P. T., Gebhardt, C. and Watanabe, K. N., "Development of SCAR markers to the PVY resistance gene *Ry* adg based on a common feature of plant disease resistance genes", *Genome* 43(1), 1-8, 2000.

Lu, Z.-X., Sossey-Alaoui, K., Reighard, G. L., Baird, W. V. and Abbott, A. G., "Development and characterization of a codominant marker linked to root-knot nematode resistance, and its application to peach rootstock breeding", *Theoretical and Applied Genetics* 99(1-2), 115-122, 1999.

McDonald, J. G., "Viruses associated with mosaic symptoms in Russet Burbank potato", *Canadian Journal of Plant Pathology* 6(3), 224-226, 1984.

McDonald, J. G. and Singh, R. P., "Host range, symptomology, and serology of isolates of potato virus Y (PVY) that share properties with both the PVY N and PVY O strain groups", *American Potato Journal* 73(7), 309-315, 1996.

Mehle, N., Kovač, M., Petrovič, N., Novak, M. P., Baebler, Š., Stres, H. K., Gruden, K. and Ravnikar, M., "Spread of potato virus YNTN in potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) with different levels of sensitivity", *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64(6), 293-300, 2004.

Mori, K., Mukojima, N., Nakao, T., Tamiya, S., Sakamoto, Y., Sohbaru, N., Hayashi, K., Watanuki, H., Nara, K. and Yamazaki, K., "Germplasm release: Saikai 35, a male and female fertile breeding line carrying *Solanum phureja*-derived cytoplasm and potato cyst nematode resistance (H1) and Potato virus Y resistance (Ry chc) genes", *American Journal of Potato Research* 89(1), 63-72, 2012.

OECD, "Consensus document on the biology of *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* (potato).", **Organisation for Economic Co-operation and Development**, 1997.

Ottoman, R. J., Hane, D. C., Brown, C. R., Yilma, S., James, S. R., Mosley, A. R., Crosslin, J. M. and Vales, M. I., "Validation and implementation of marker-assisted selection (MAS) for PVY resistance (Ry adg gene) in a tetraploid potato breeding program", *American Journal of Potato Research* 86(4), 304-314, 2009.

Ridout, C. J., Donini, P., Ridout, C. J. and Donini, P., "Use of AFLP in cereals research", *Trends in Plant Science* 4(2), 76-79, 1999.

Ruiz de Arcaute, R., Isla, S. and Carrasco, A., "New strategies on breeding for PVY resistance", *15th The European Association for Potato Research*, Hamburg, Germany, 28-31 Mayis, 2002.

Sagredo, B., Mathias, M., Barrientos, C., Acuña, I., Kalazich, J. and Rojas, J., "Evaluation of a SCAR RYSC3 marker of the Ryadg gene to select resistant genotypes to Potato virus Y (PVY) in the INIA Potato Breeding Program", *Chilean Journal of Agricultural Research* 69(3), 305-315, 2009.

Salazar, L. F., Potato Viruses and Their Control, *International Potato Center*, Peru, 1996.

Shukla, D. D., Ward, C. W. and Brunt, A. A., The Potyviridae, *Cambridge University Press*, Cambridge, United Kingdom, 2001.

Simko, I., Jansky, S., Stephenson, S. and Spooner, D., Genetics of Resistance to Pests and Disease, In: Potato Biology and Biotechnology, *Elsevier*, United Kingdom, 2007.

Singh, M. and Singh, R. P., "Factors affecting detection of PVY in dormant tubers by reverse transcription polymerase chain reaction and nucleic acid spot hybridization", *Journal of Virological Methods* 60(1), 47-57, 1996.

Singh, R. P., "A solvent-free, rapid and simple virus RNA-release method for potato leafroll virus detection in aphids and plants by reverse transcription polymerase chain reaction", *Journal of Virological Methods* 83(1-2), 27-33, 1999.

Singh, R. P. and Somerville, T. H., "Evaluation of the enzyme-amplified ELISA for the detection of potato viruses A, M, S, X, Y, and leafroll", *American Potato Journal* 69(1), 21-30, 1992.

Slack, S. A., "Potato viruses with some implications for production and processing in the United States: a history of problems and solutions", *Summa Phytopathologica* 21(3-4), 273-275, 1995.

Song, Y.-S., Hepting, L., Schweizer, G., Hartl, L., Wenzel, G. and Schwarzfischer, A., "Mapping of extreme resistance to PVY (Ry sto) on chromosome XII using anther-culture-derived primary dihaploid potato lines", *Theoretical and Applied Genetics* 111(5), 879-887, 2005.

Spetz, C., Taboada, A. M., Darwich, S., Ramsell, J., Salazar, L. F. and Valkonen, J. P. T., "Molecular resolution of a complex of potyviruses infecting solanaceous crops at the centre of origin in Peru", *Journal of General Virology* 84(9), 2565-2578, 2003.

Spiegel, S. and Martin, R. R., "Improved detection of potato leafroll virus in dormant potato tubers and microtubers by the polymerase chain reaction and ELISA", *Annals of Applied Biology* 122(3), 493-500, 1993.

Staub, J. E., Serquen, F. C. and Gupta, M., "Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding", *Hort Science* 31(5), 729-741, 1996.

Stevenson, W. R., Loria, R., Franc, G. D. and Weingartner, D. P., Compendium of Potato Diseases, *APS Press*, Minnesota, USA, 2001.

Takeuchi, T., "High-resolution maps and DNA markers of the Potato virus Y resistance gene Rychc and the potato cyst nematode resistance gene H1", *Breeding Research* 10(1), 148-155, 2008.

Tiwari, J. K., Gopal, J. and Singh, B. P., "Marker-assisted selection for virus resistance in potato: options and challenges", *Potato Journal* 39(2), 101-117, 2012.

Vardar-Kanlıtepe, Ç., Aras, S. and Cansaran-Duman, D., "Application of the molecular marker and gene transfer in plant breeding", *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 67(1), 33-43, 2010.

Varveri, C., "Potato Y potyvirus detection by immunological and molecular techniques in plants and aphids", *Phytoparasitica* 28(2), 141-148, 2000.

Walkey, D. G. A., Applied Plant Virology, *Edmundsbury Press*, Suffolk, USA, 1991.

Ward, C. W. and Shukla, D. D., "Taxonomy of potyviruses: current problems and some solutions", *Intervirology* 32(5), 269-296, 1991.

Warren, M., Kruger, K. and Schoeman, A. S., Potato Virus Y (PVY) and Potato Leafroll Virus (PLRV), A South African Perspective, **University of Pretoria**, South Africa, 2005.

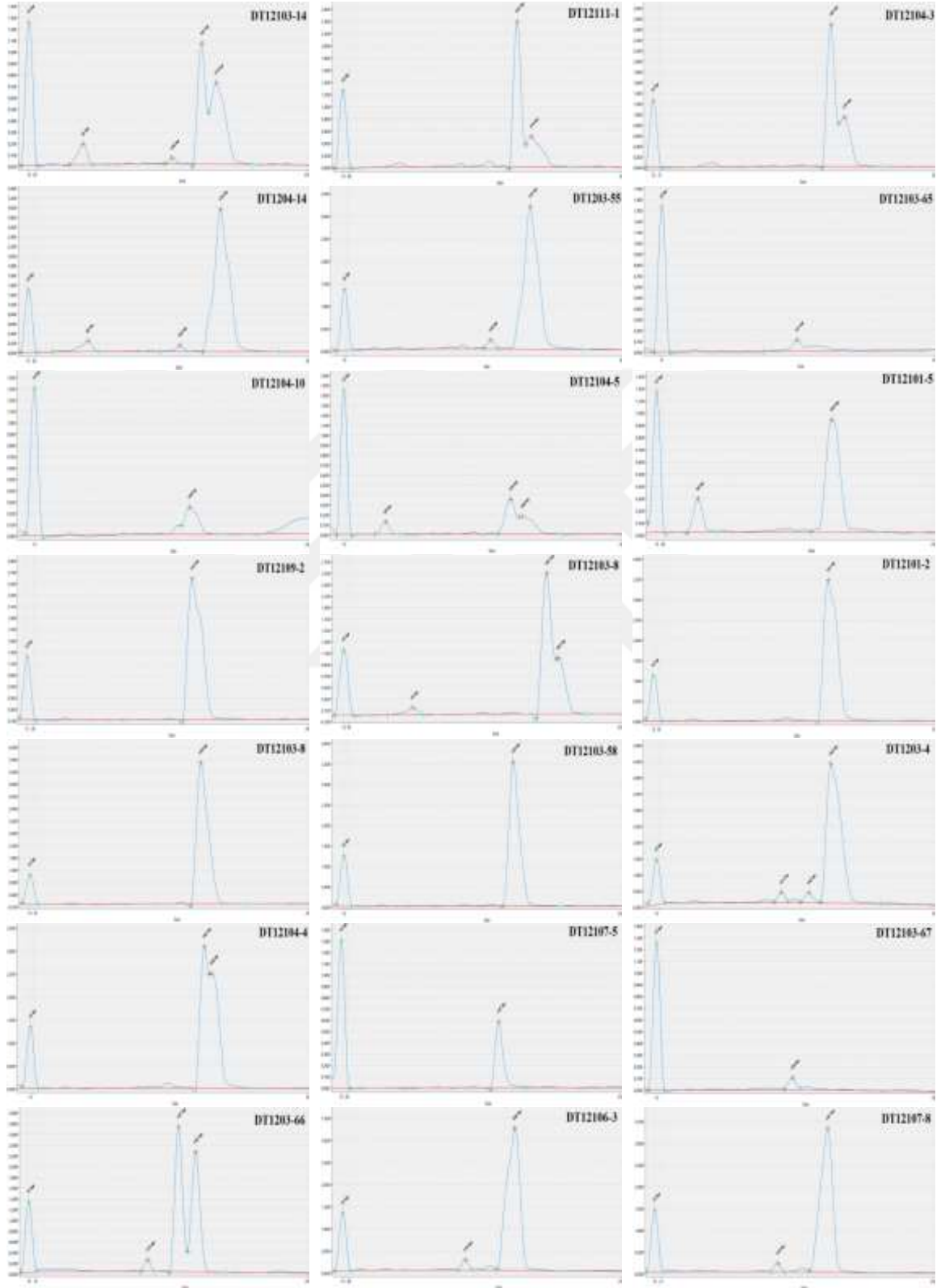
Watanabe, K., Orrillo, M., Iwanaga, M., Ortiz, R., Freyre, R. and Perez, S., "Diploid potato germplasm derived from wild and land race genetic resources", **American Potato Journal** 71(9), 599-604, 1994.

Whitham, S. A. and Wang, Y., "Roles for host factors in plant viral pathogenicity", **Current Opinion in Plant Biology** 7(4), 365-371, 2004.

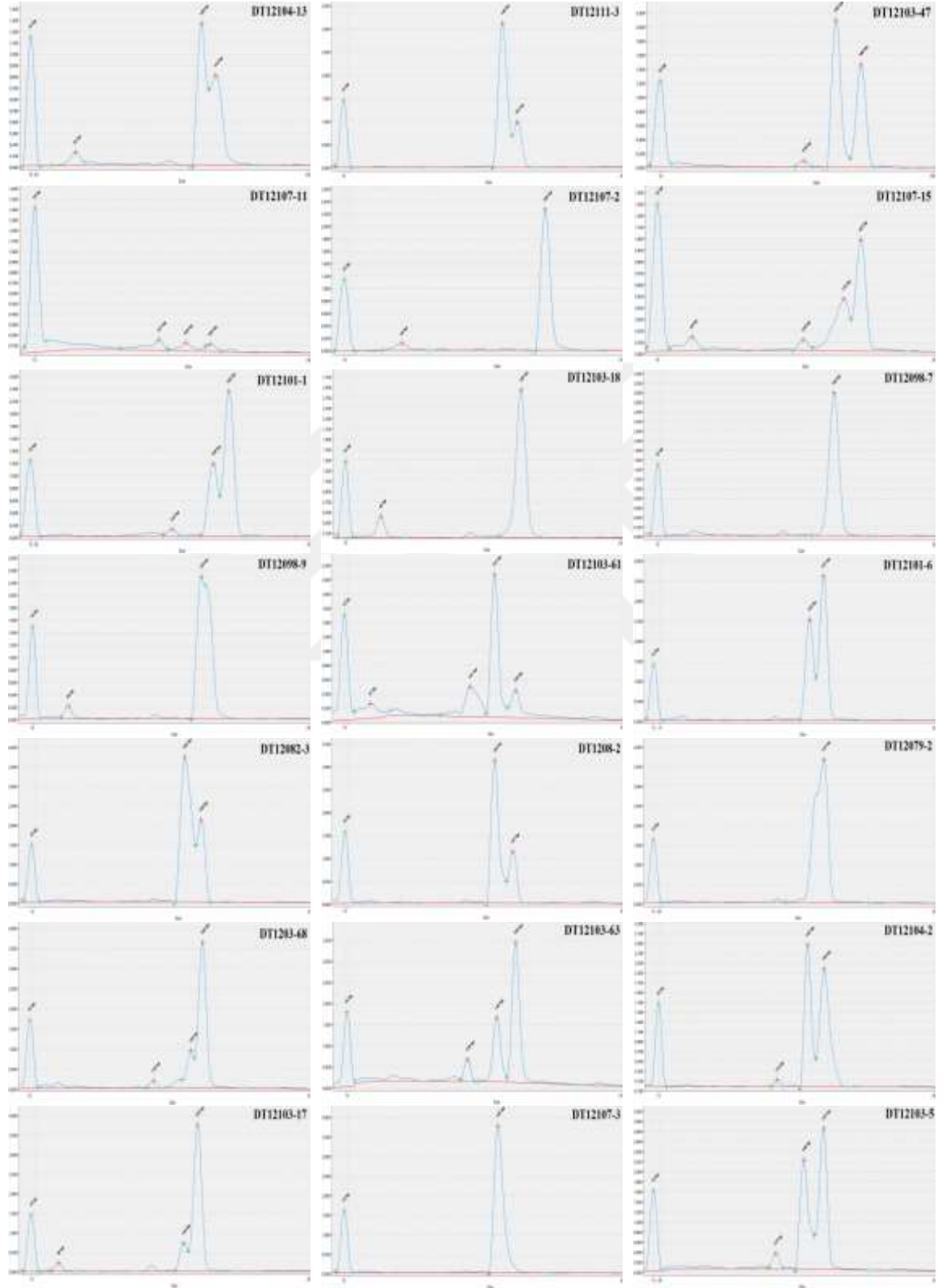
Witek, K., Strzelczyk-Żyta, D., Hennig, J. and Marczewski, W., "A multiplex PCR approach to simultaneously genotype potato towards the resistance alleles Ry-f sto and Ns", **Molecular Breeding** 18(3), 273-275, 2006.

Yıldırım, A. ve Kandemir, N., Bitki Biyoteknolojisi II, Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, Genetik Markörler ve Analiz Metodları, **Selçuk Üniversitesi Vakıf Yayınları**, Konya, 2001.

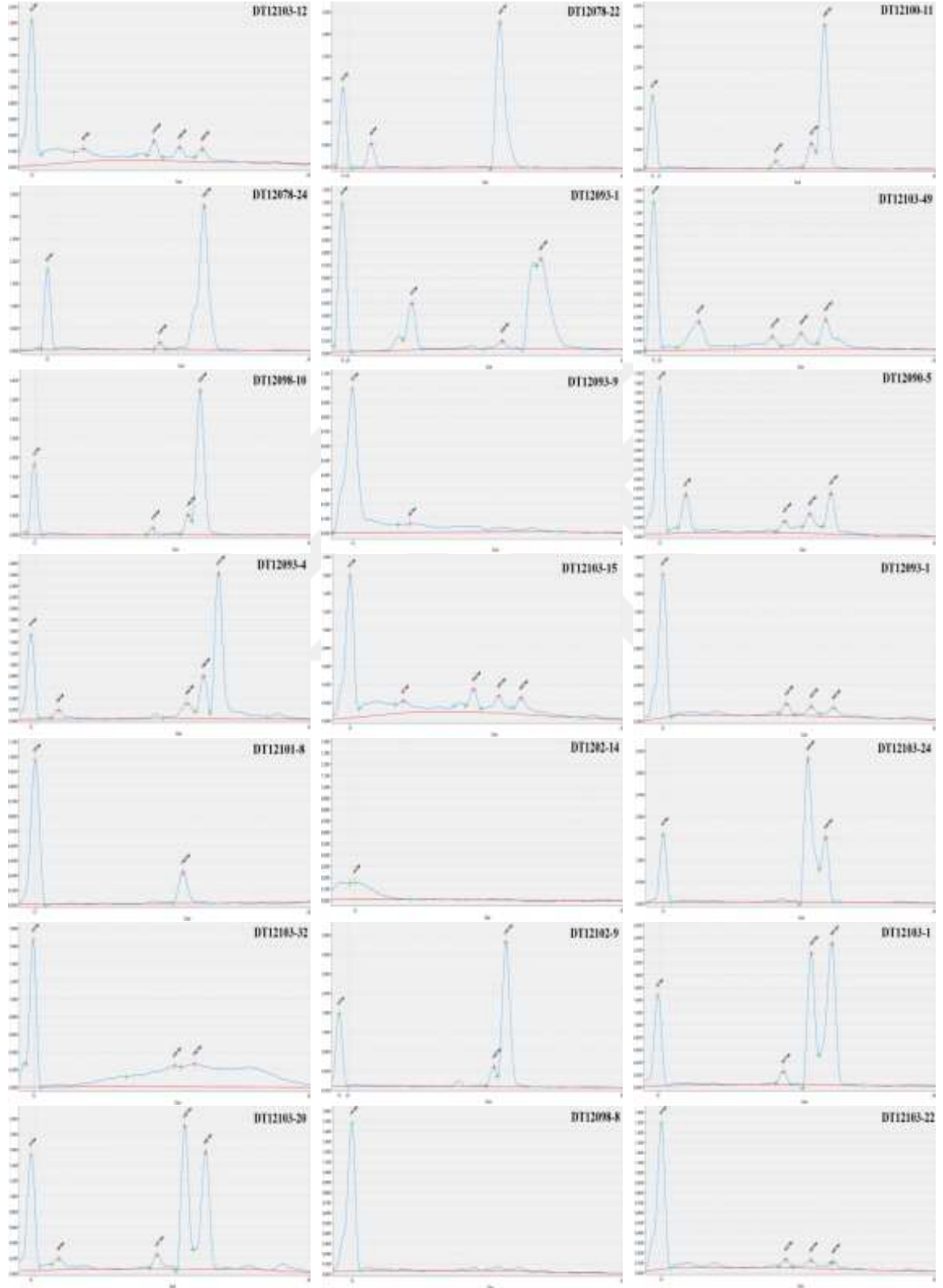
Ek-A Islah hatlarının STM0003 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



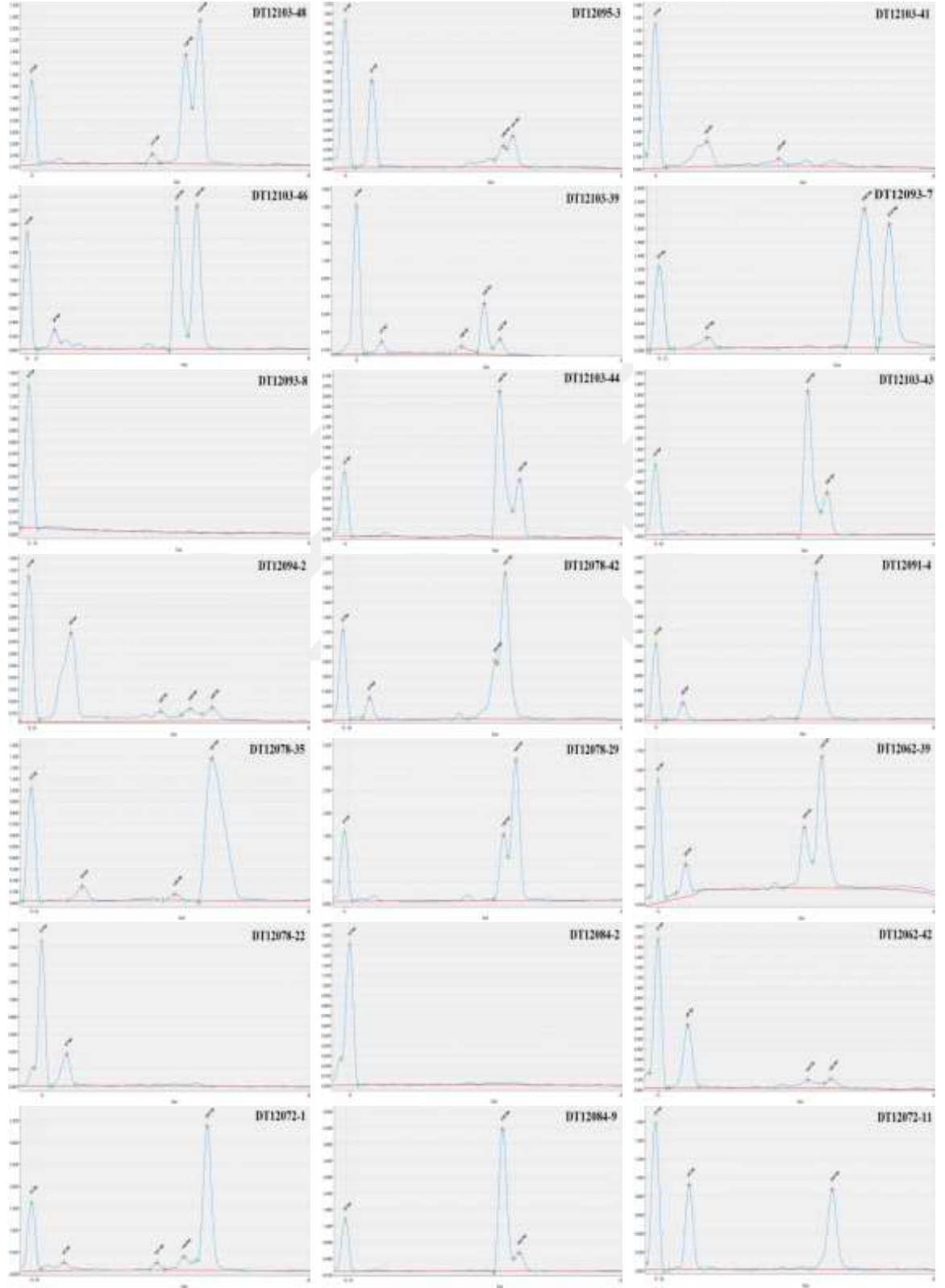
Ek-A (Devam) Islah hatlarının STM0003 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



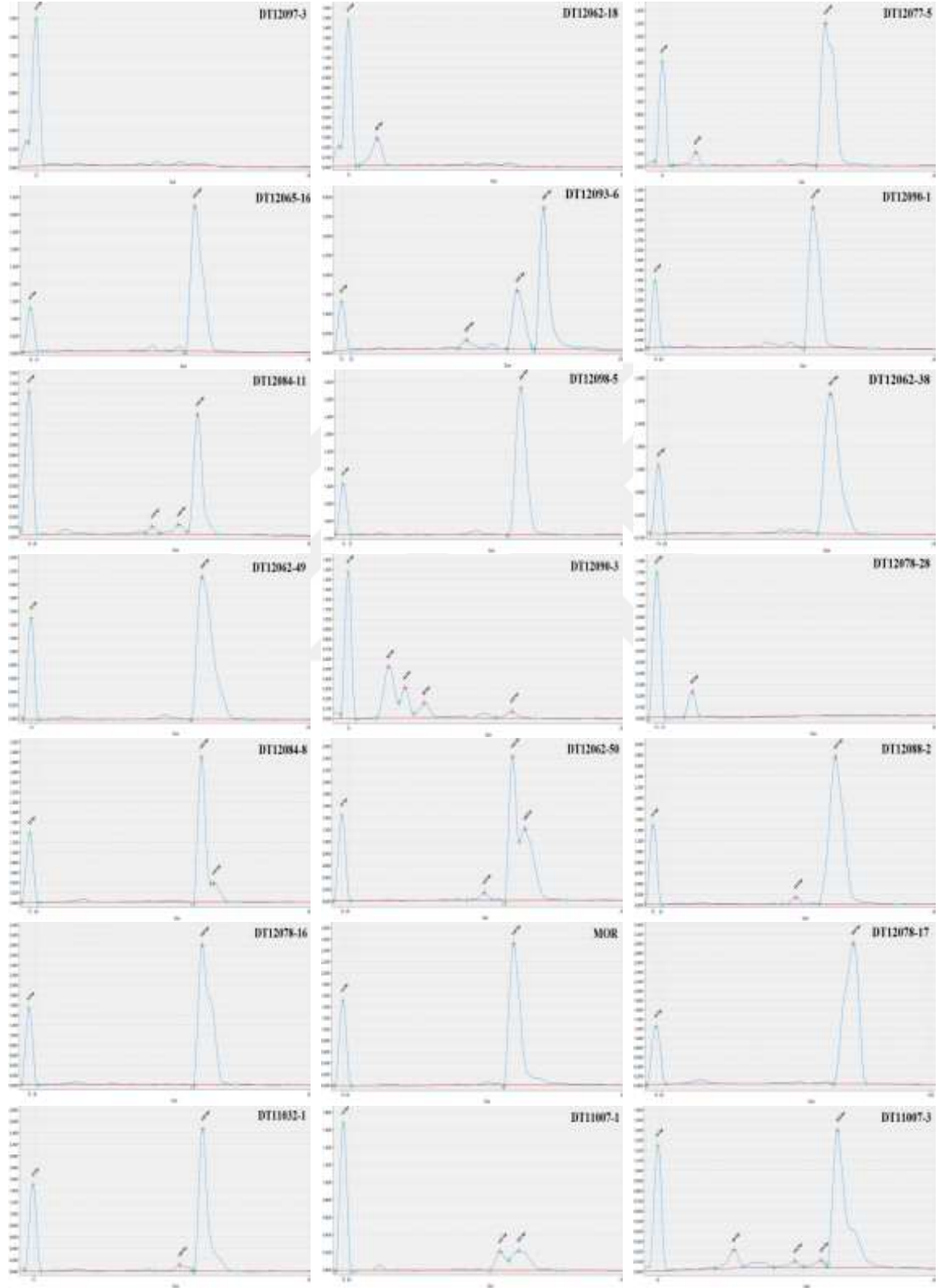
Ek-A (Devam) Islah hatlarının STM0003 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



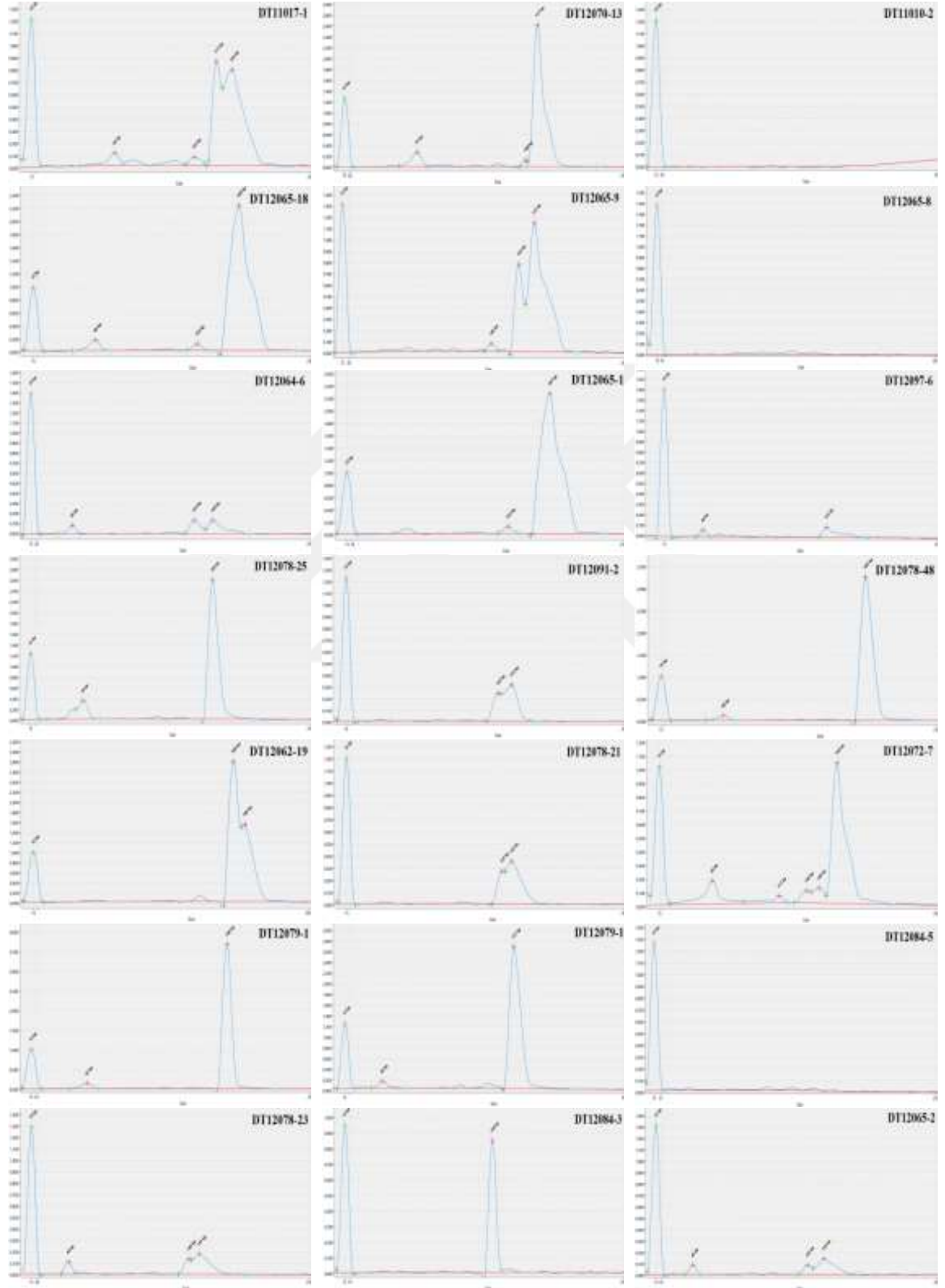
Ek-A (Devam) Islah hatlarının STM0003 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



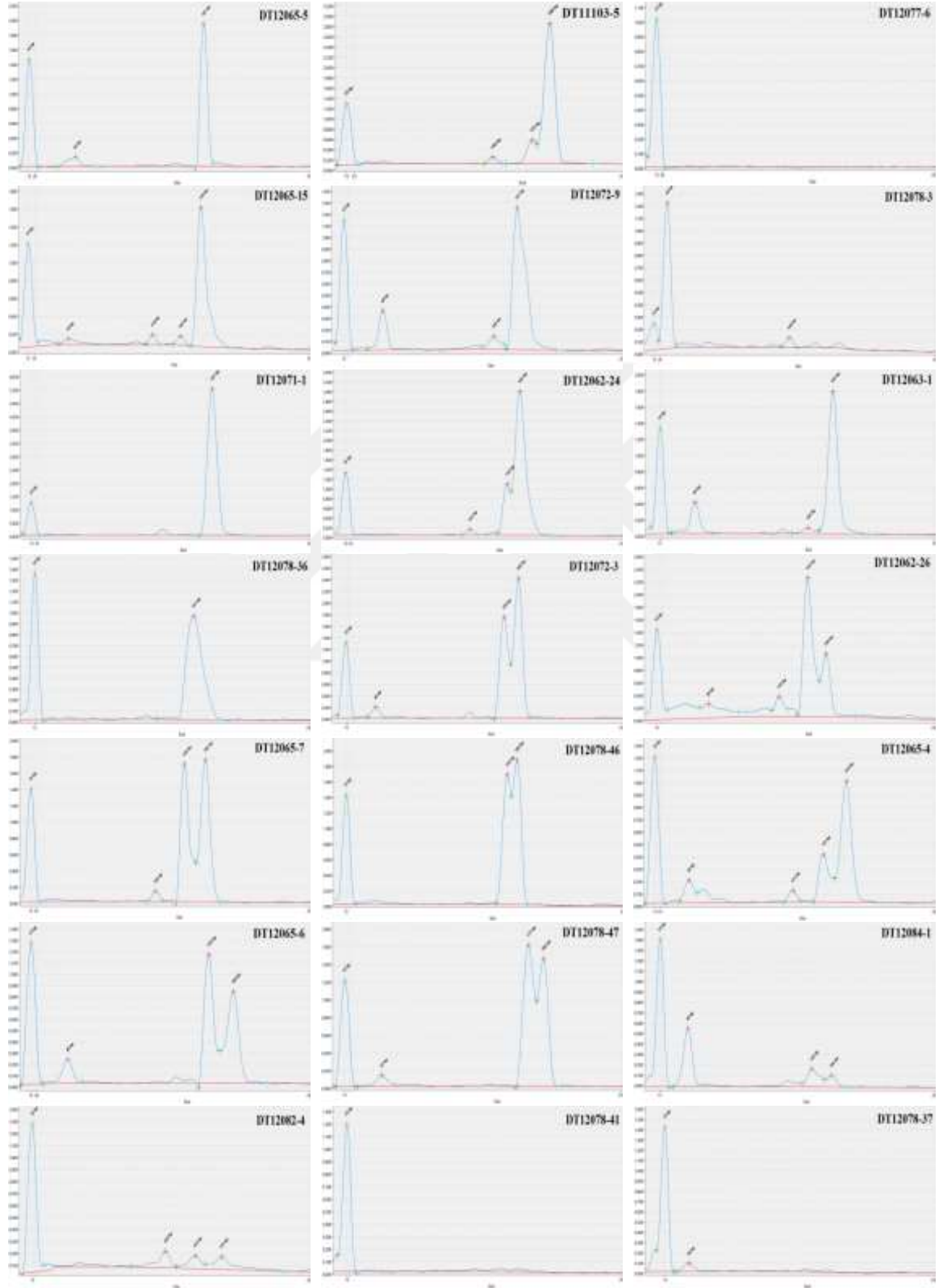
Ek-A (Devam) Islah hatlarının STM0003 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



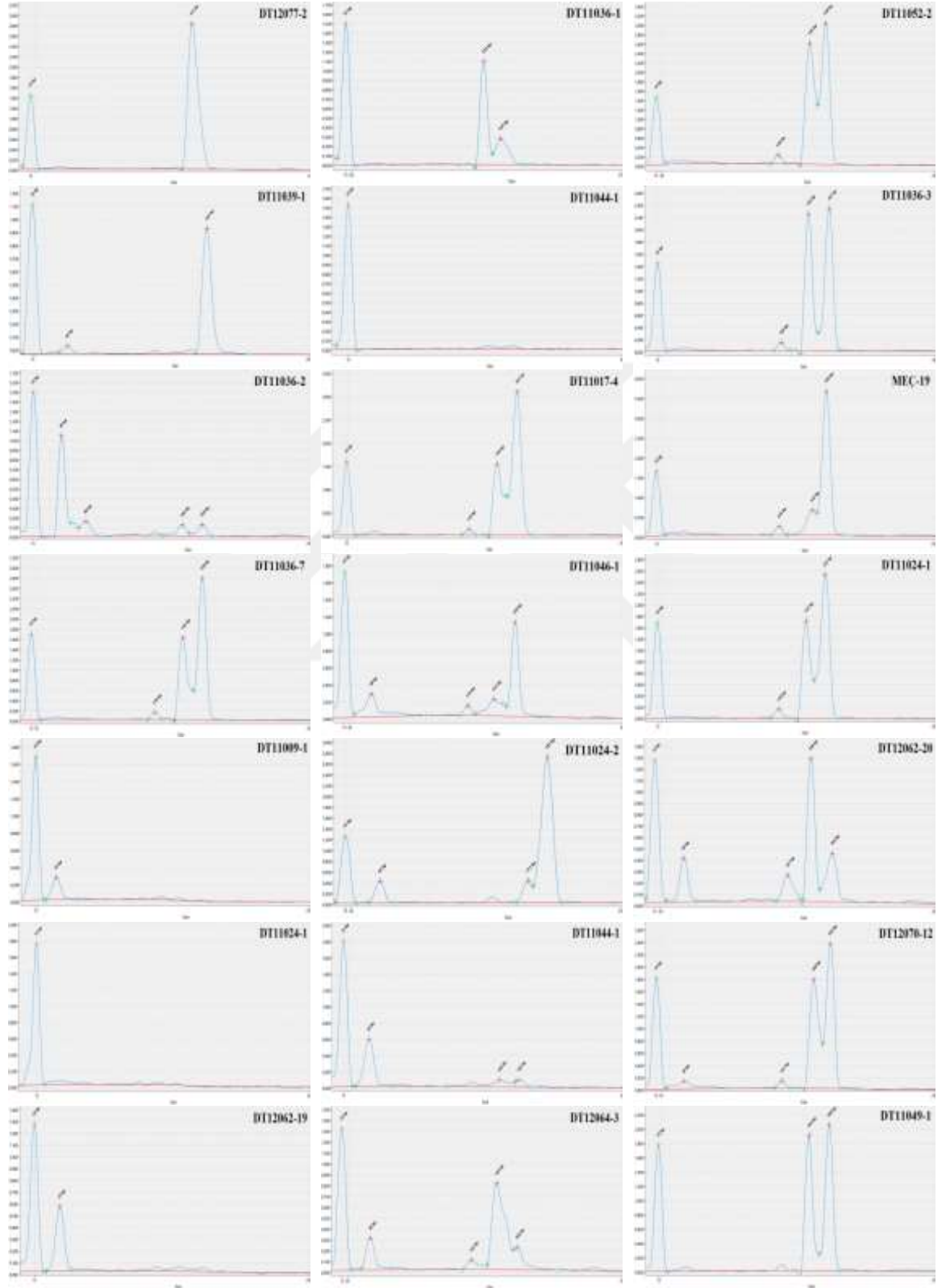
Ek-A (Devam) Islah hatlarının STM0003 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



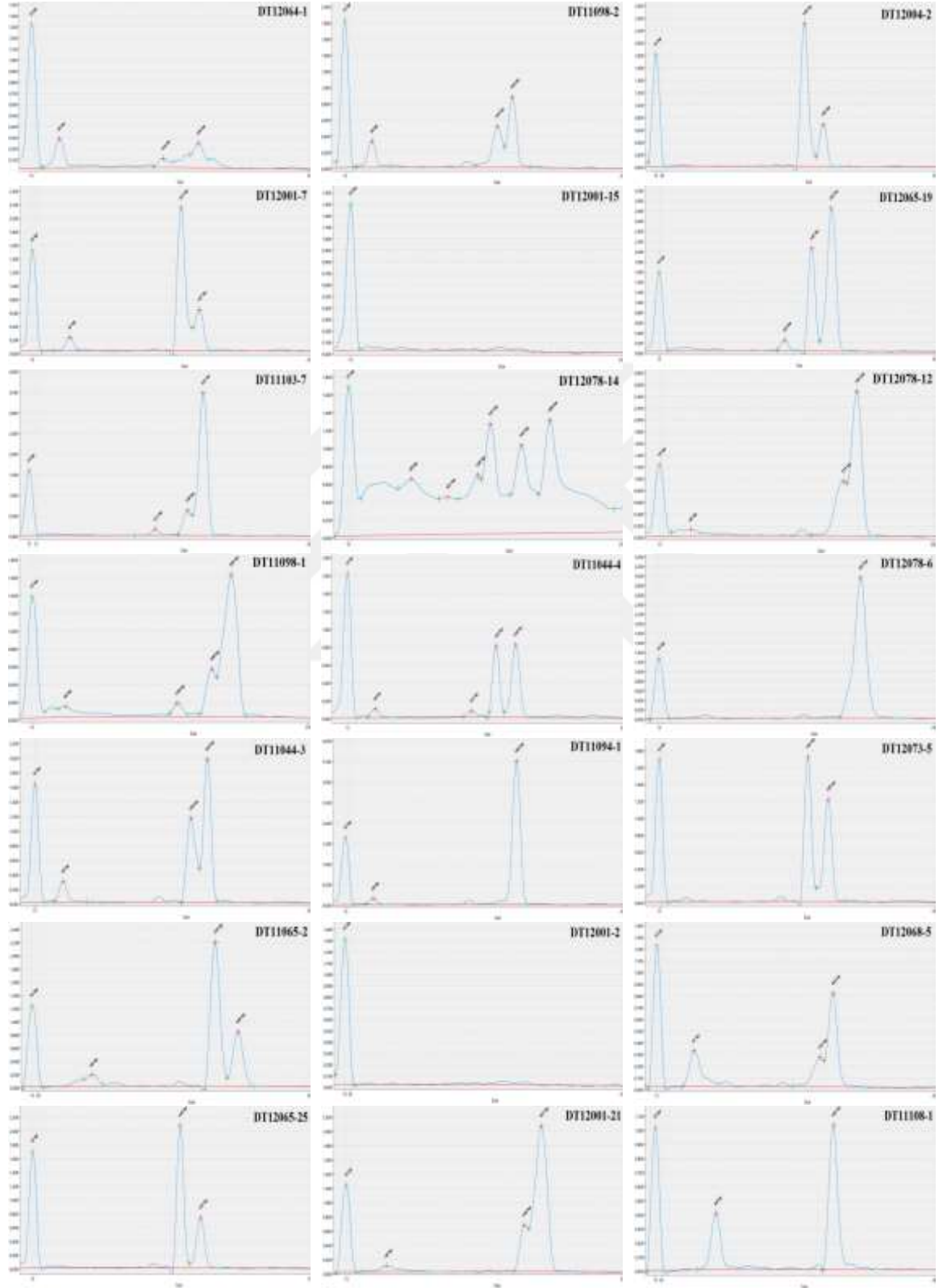
Ek-A (Devam) Islah hatlarının STM0003 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



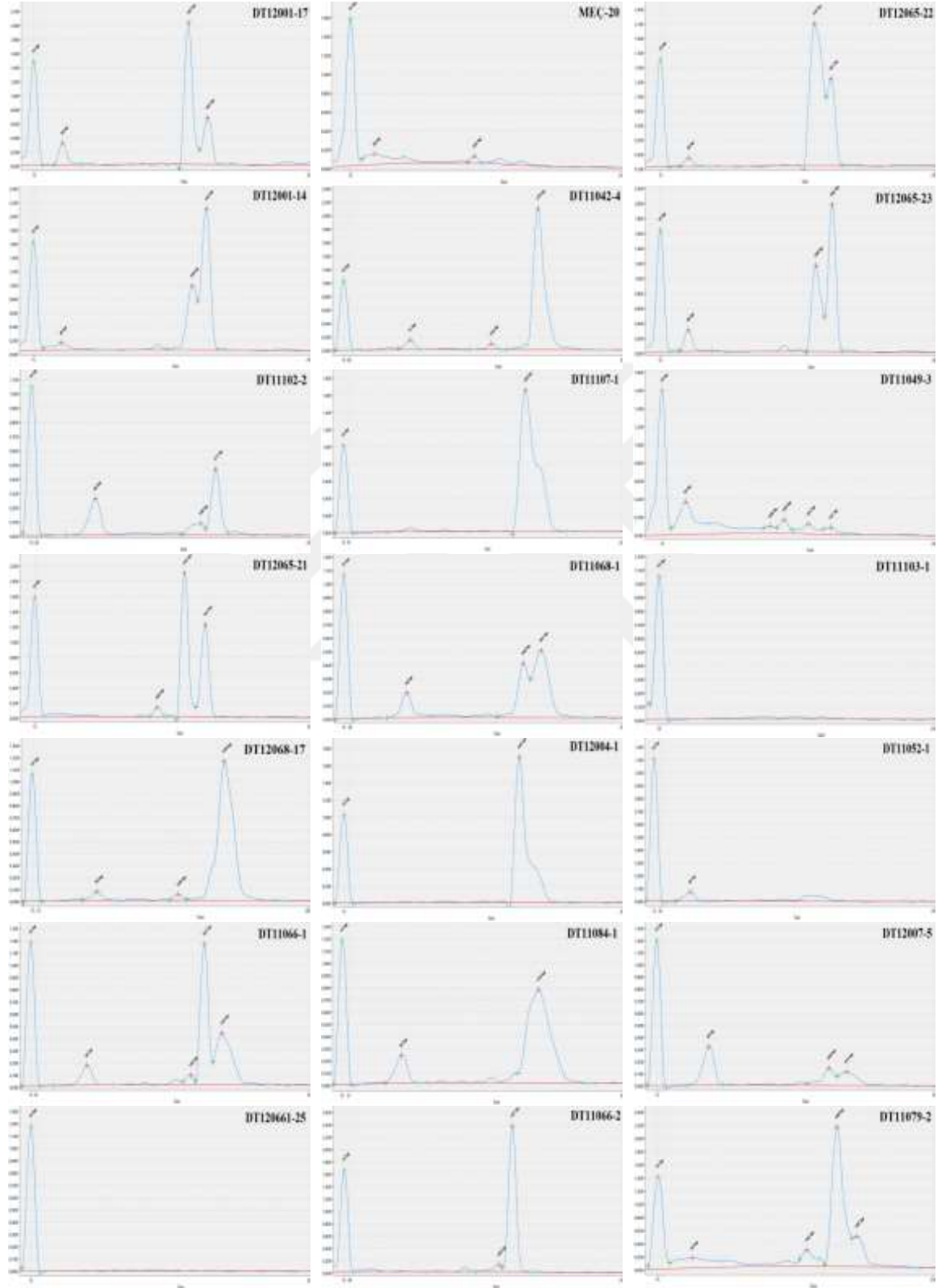
Ek-A (Devam) Islah hatlarının STM0003 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



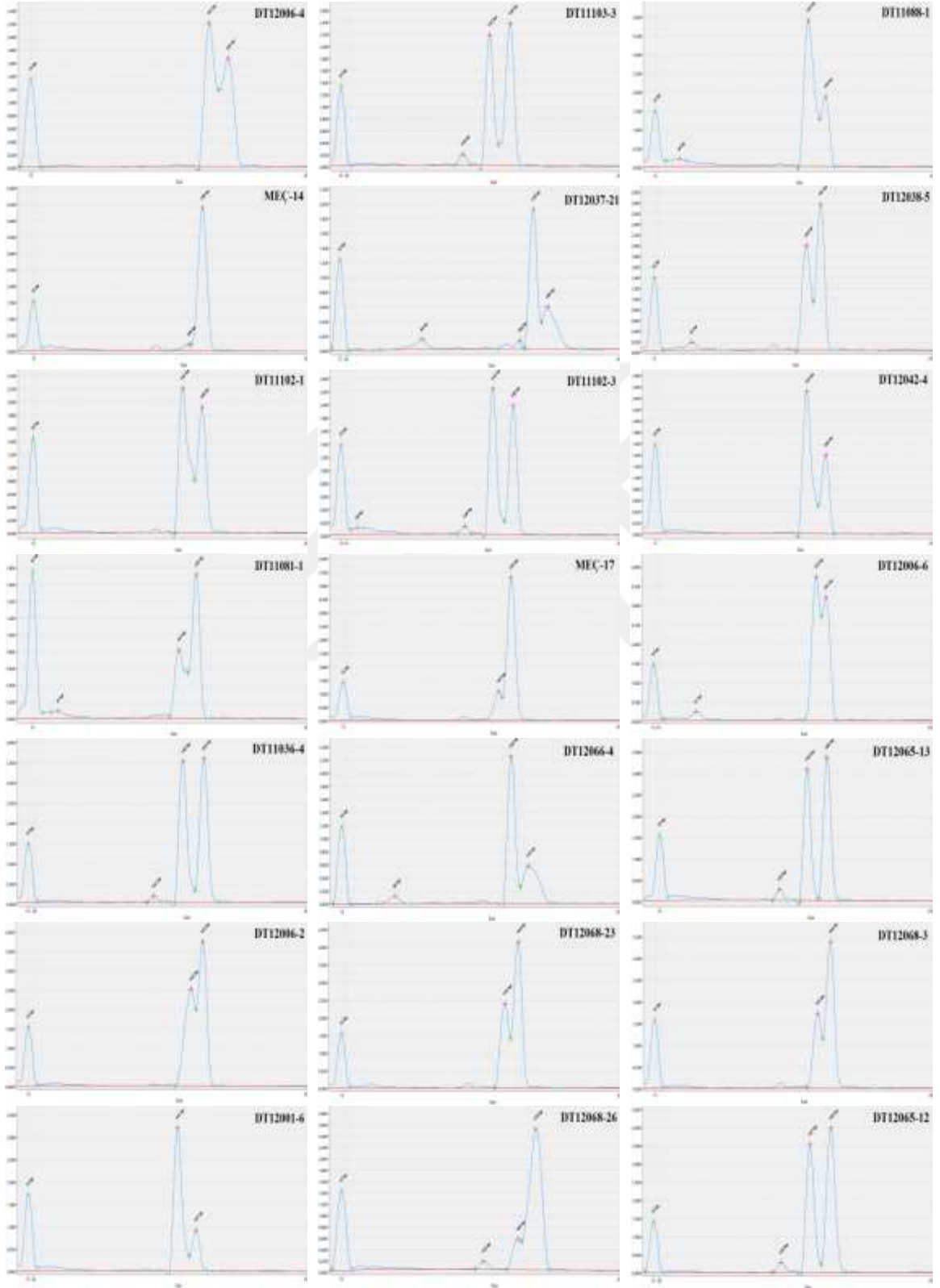
Ek-A (Devam) Islah hatlarının STM0003 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



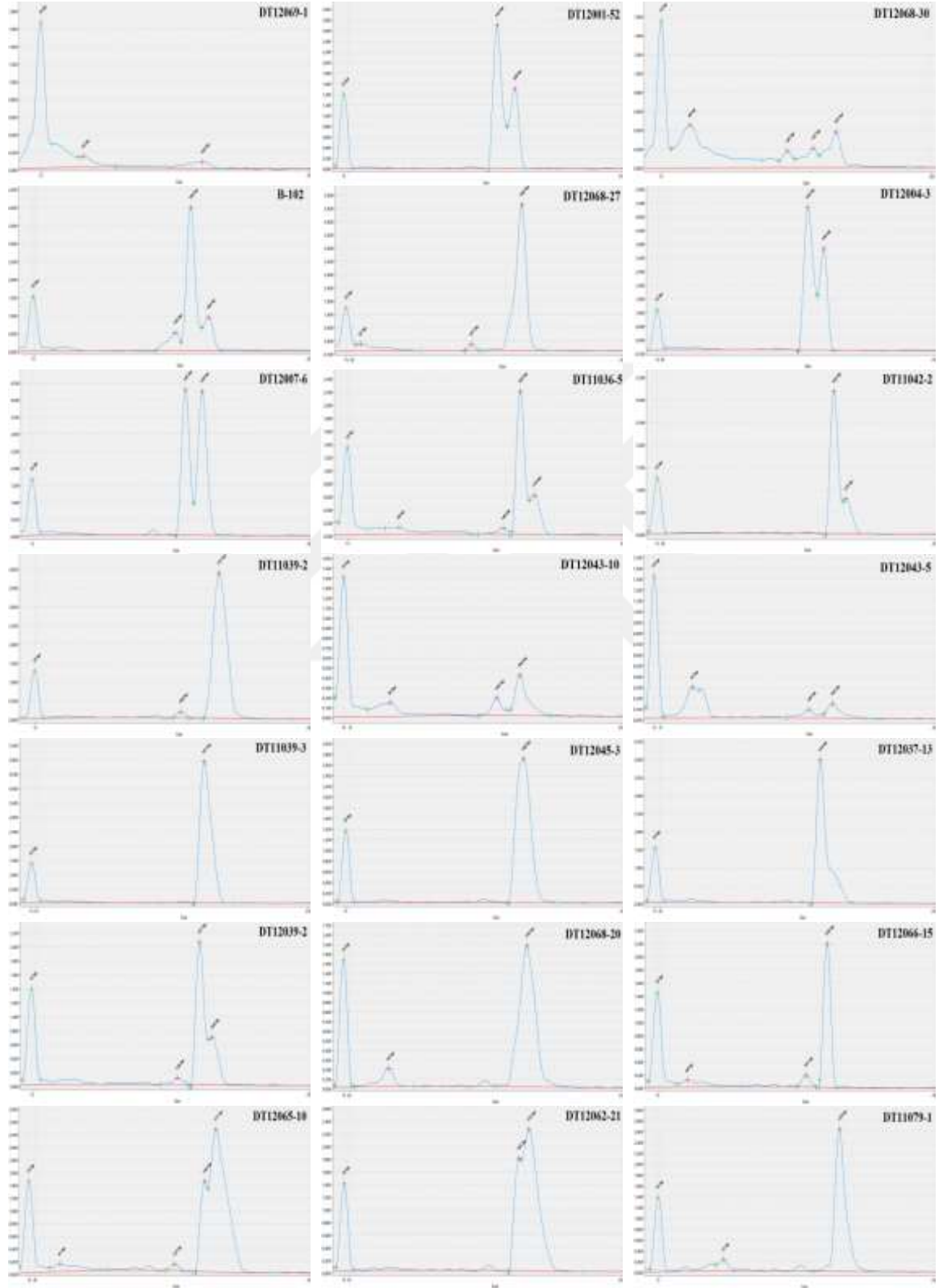
Ek-A (Devam) Islah hatlarının STM0003 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



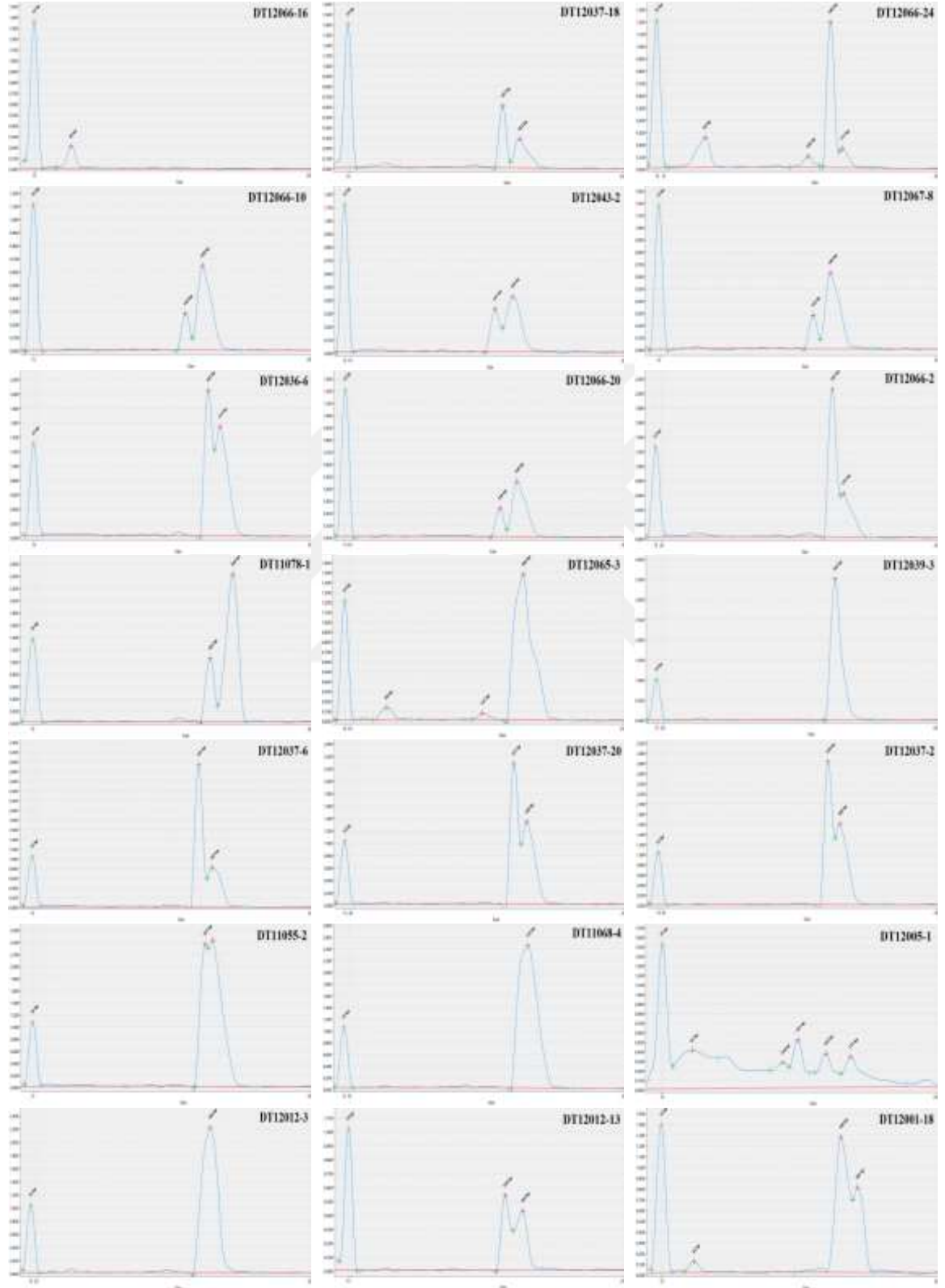
Ek-A (Devam) Islah hatlarının STM0003 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



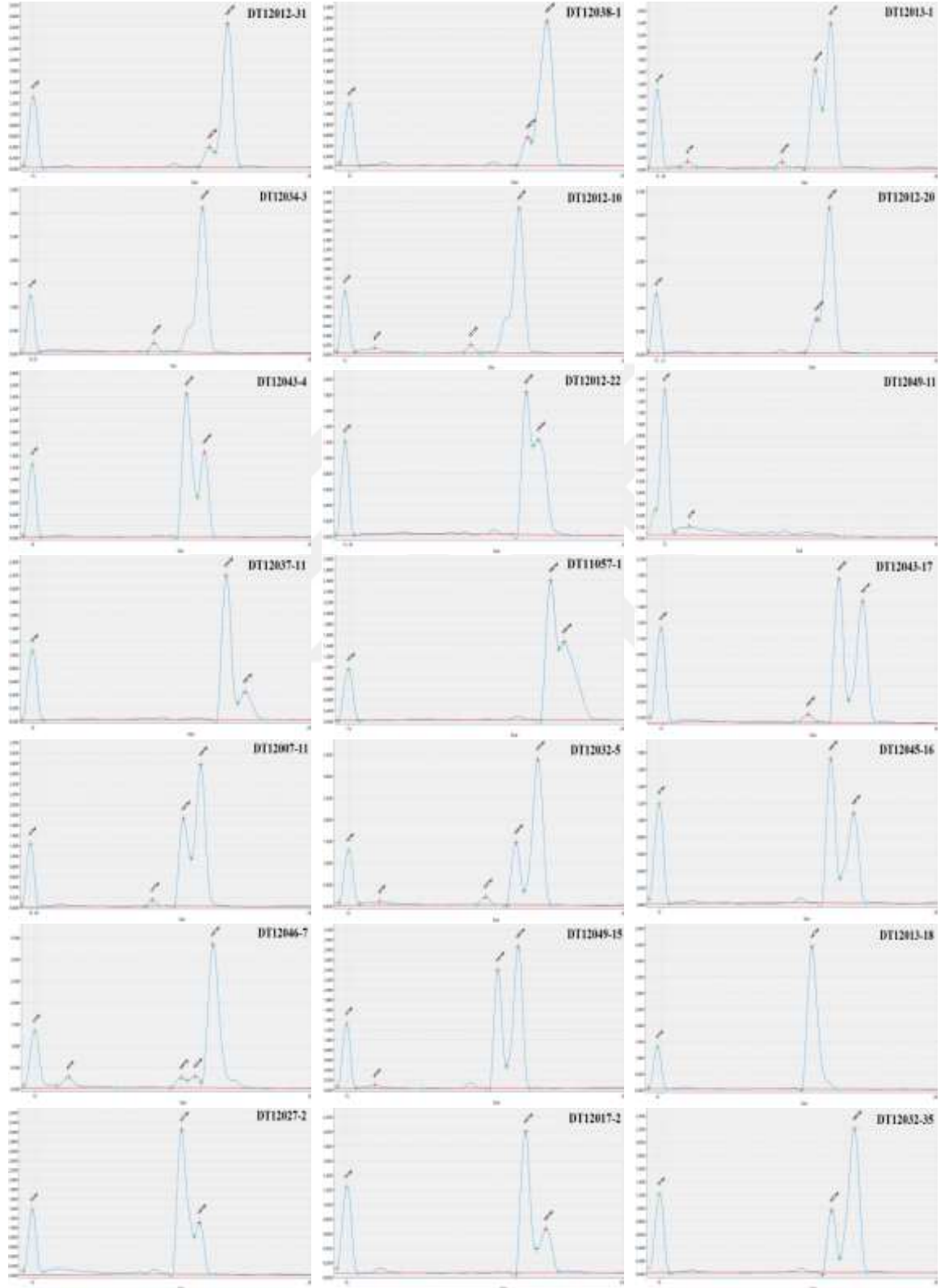
Ek-A (Devam) Islah hatlarının STM0003 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



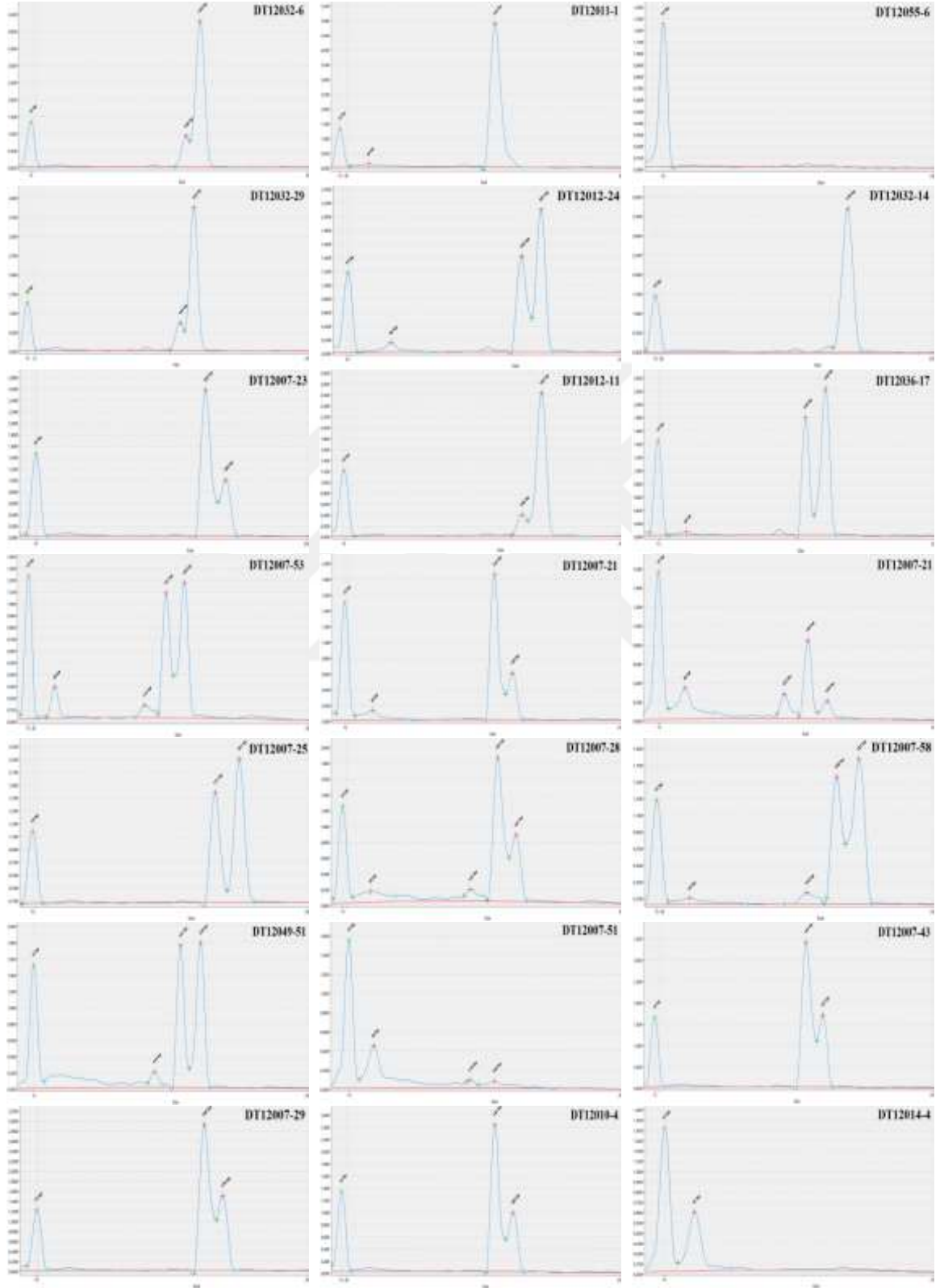
Ek-A (Devam) Islah hatlarının STM0003 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



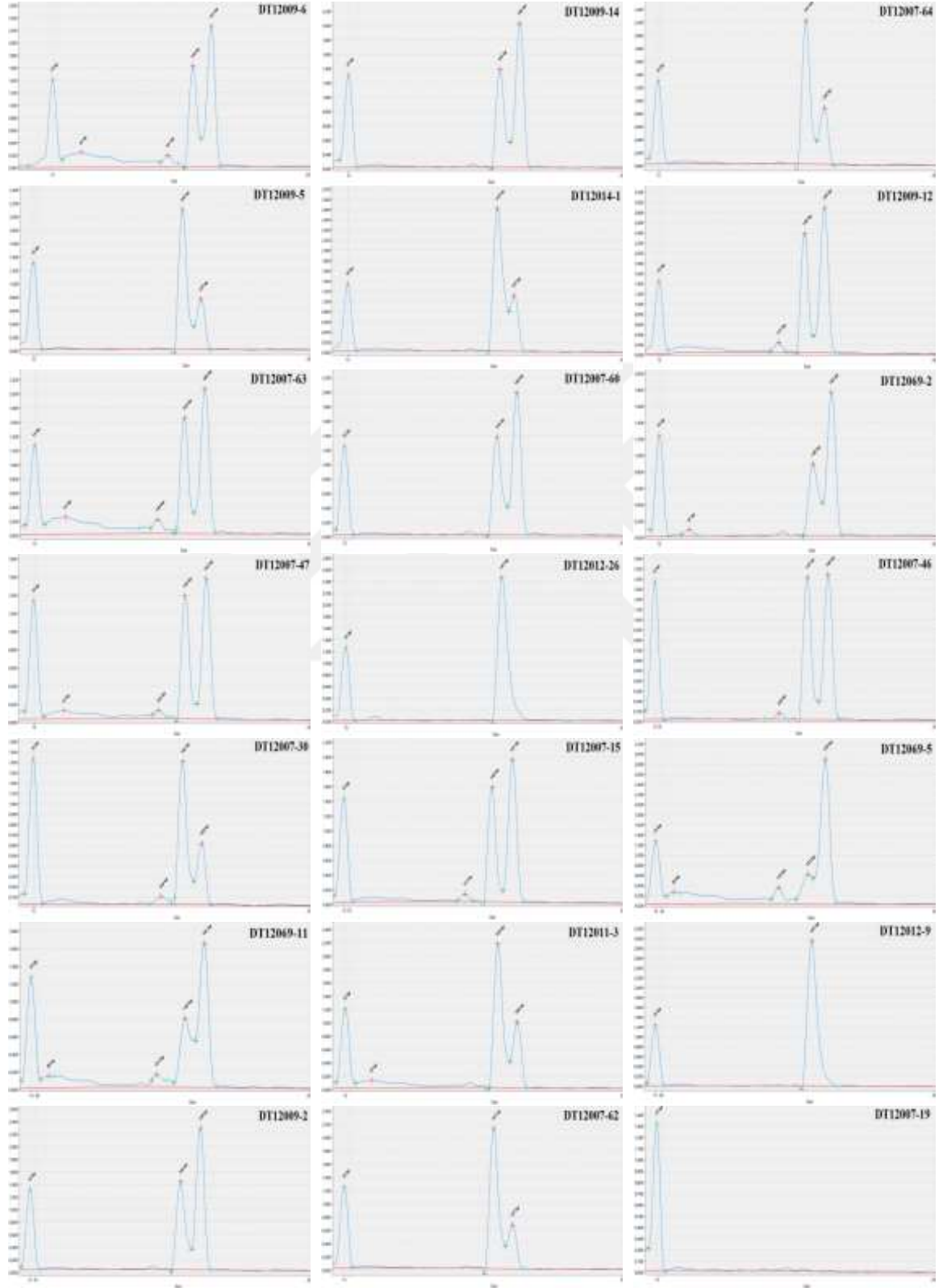
Ek-A (Devam) Islah hatlarının STM0003 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



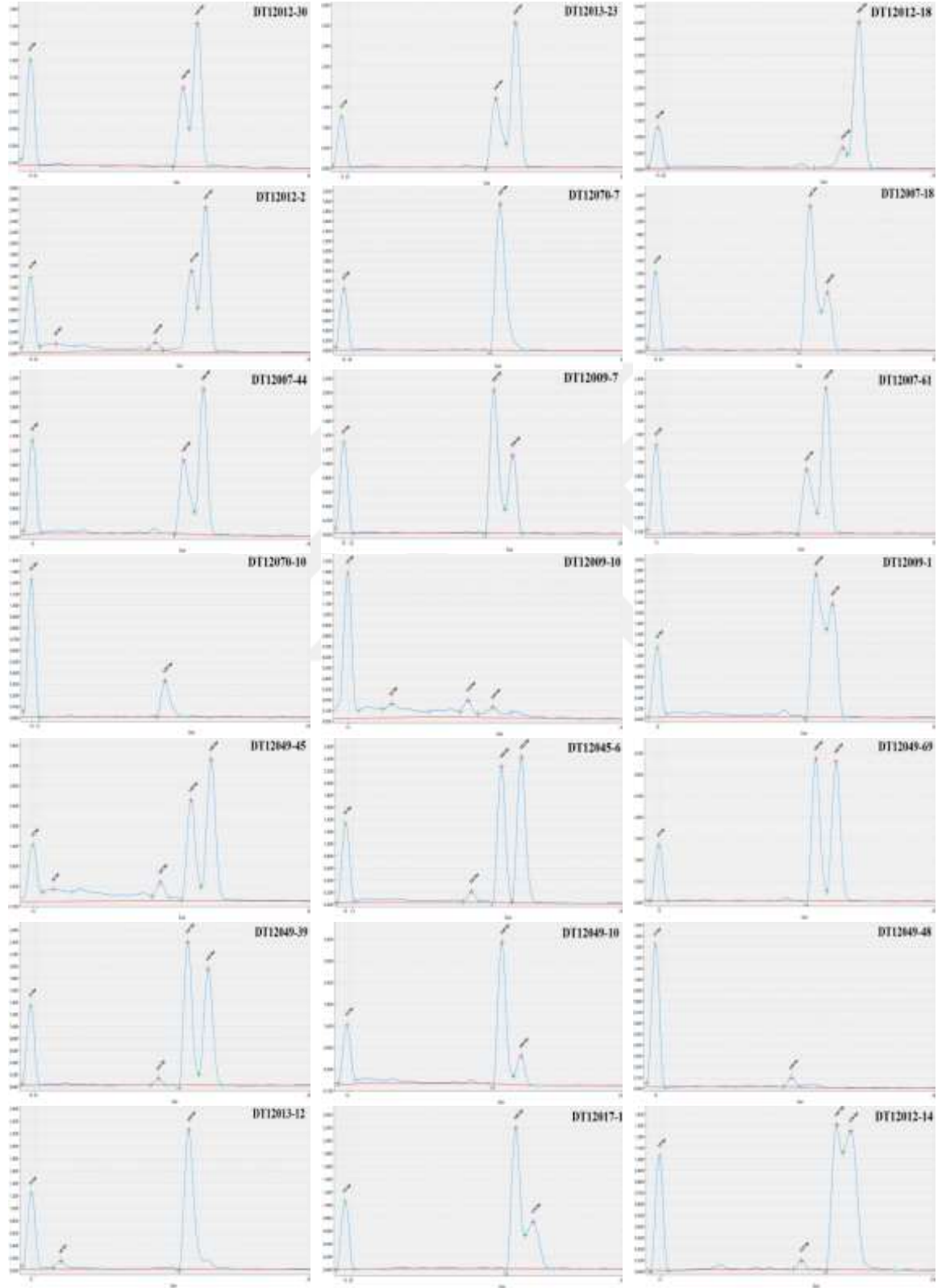
Ek-A (Devam) Islah hatlarının STM0003 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



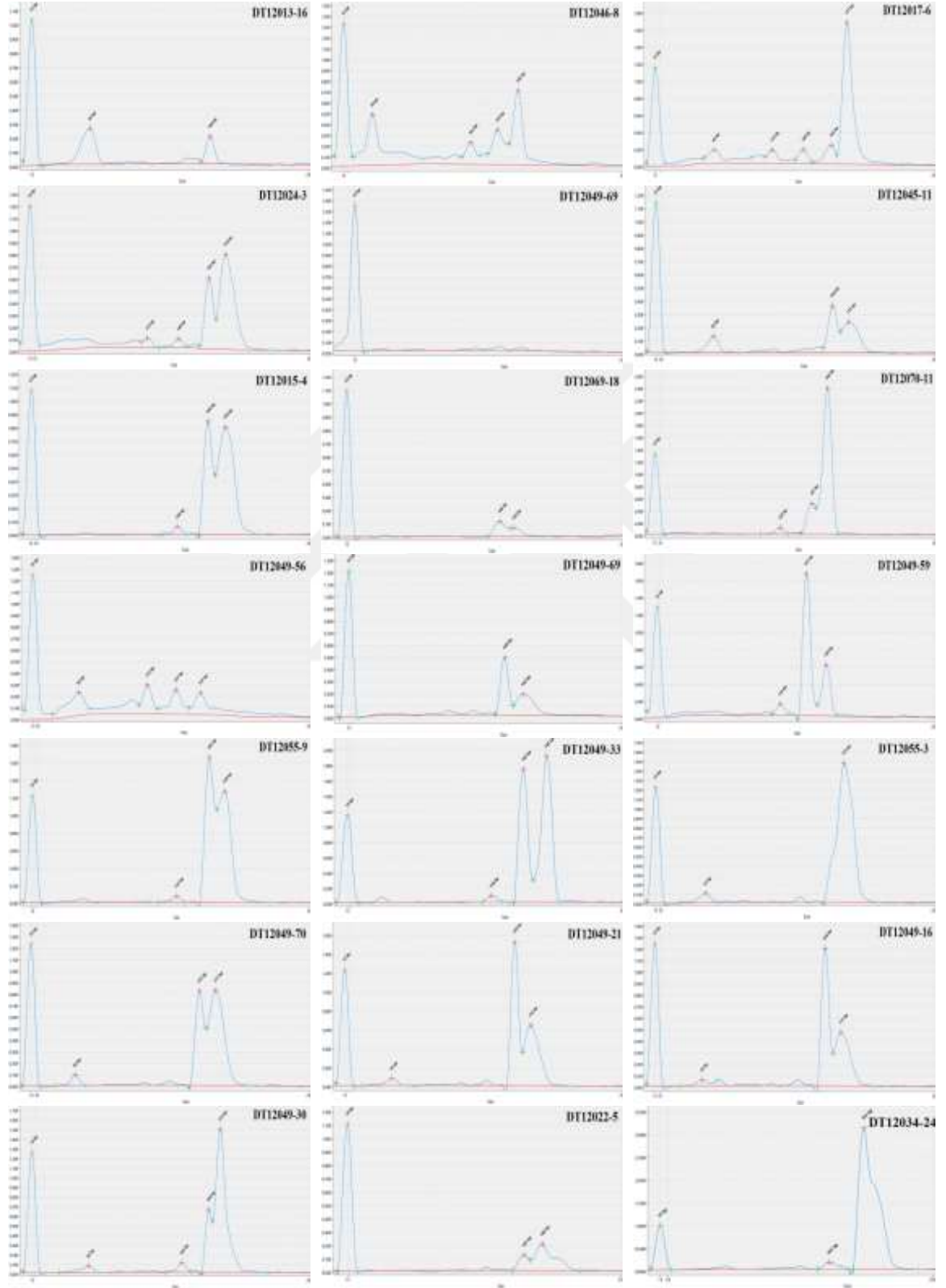
Ek-A (Devam) Islah hatlarının STM0003 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



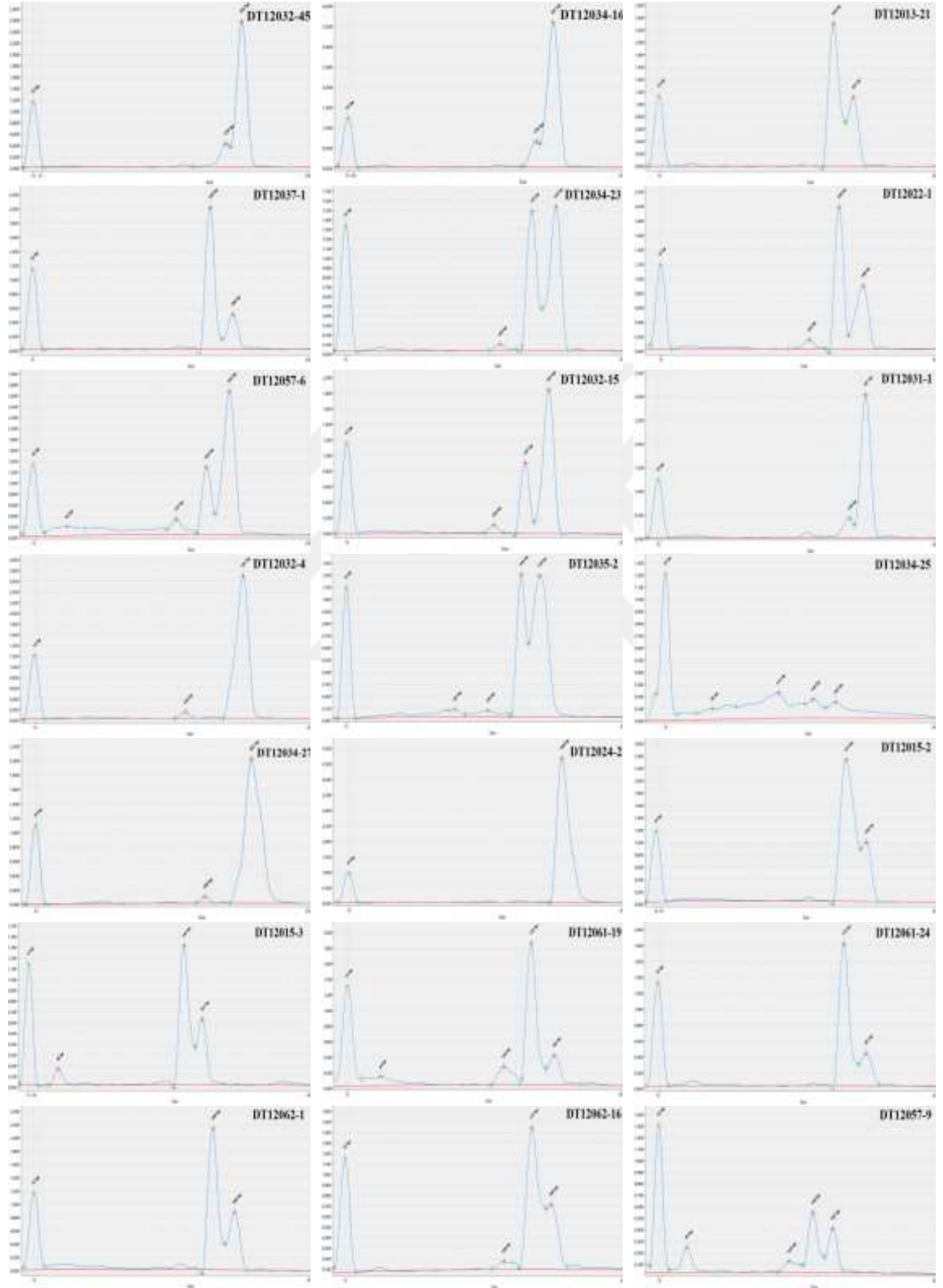
Ek-A (Devam) Islah hatlarının STM0003 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



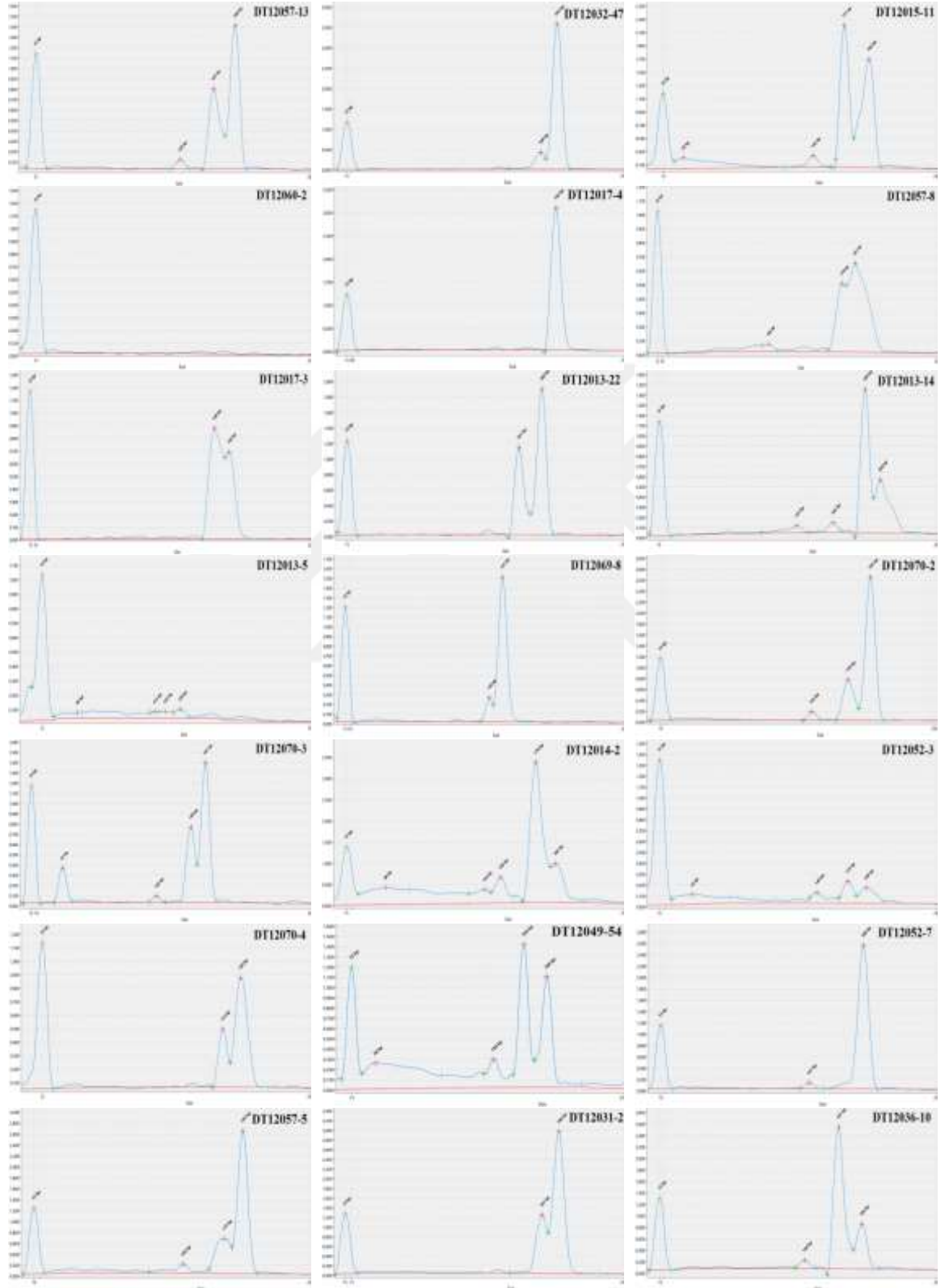
Ek-A (Devam) Islah hatlarının STM0003 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



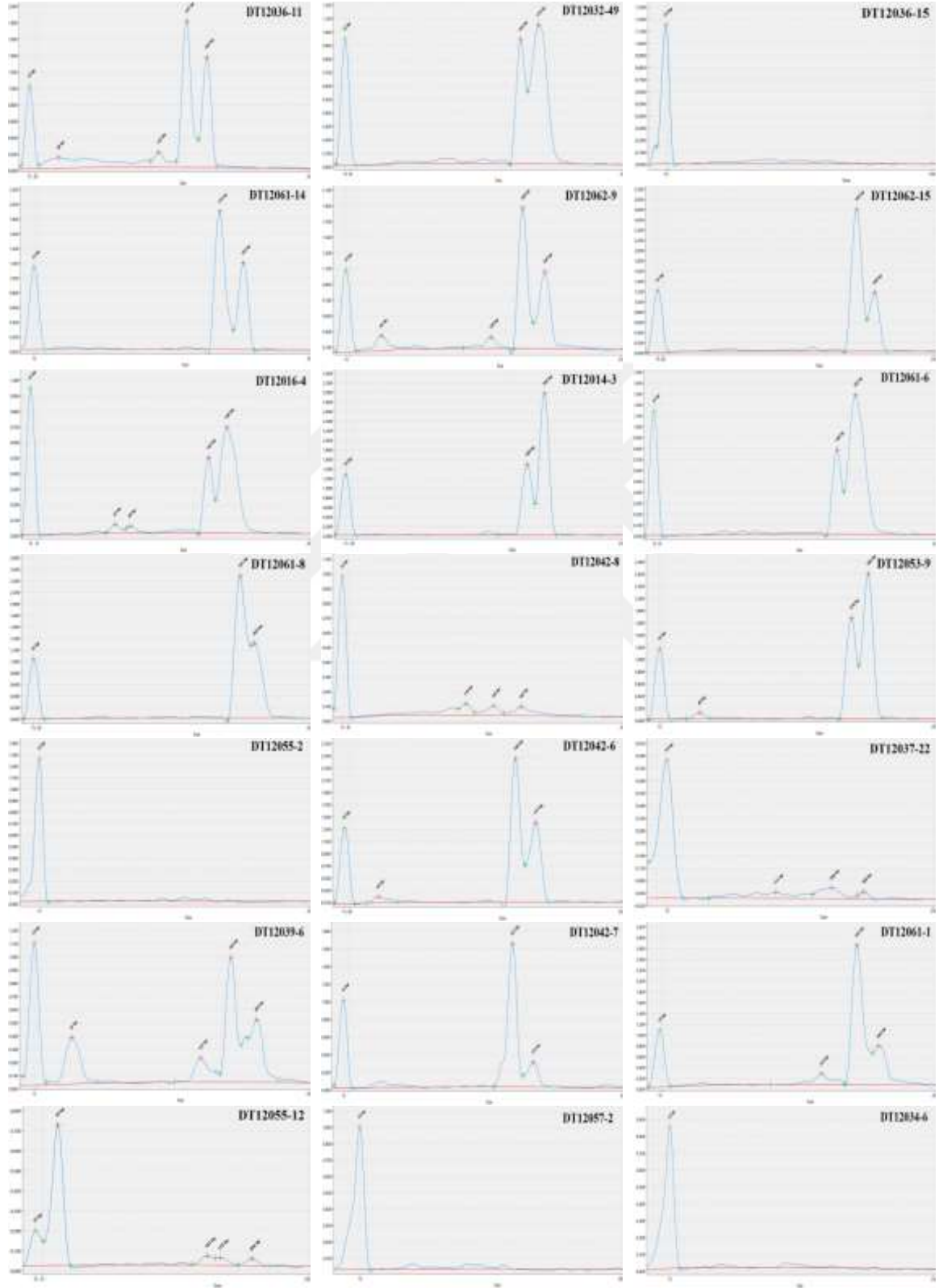
Ek-A (Devam) Islah hatlarının STM0003 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



Ek-A (Devam) Islah hatlarının STM0003 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



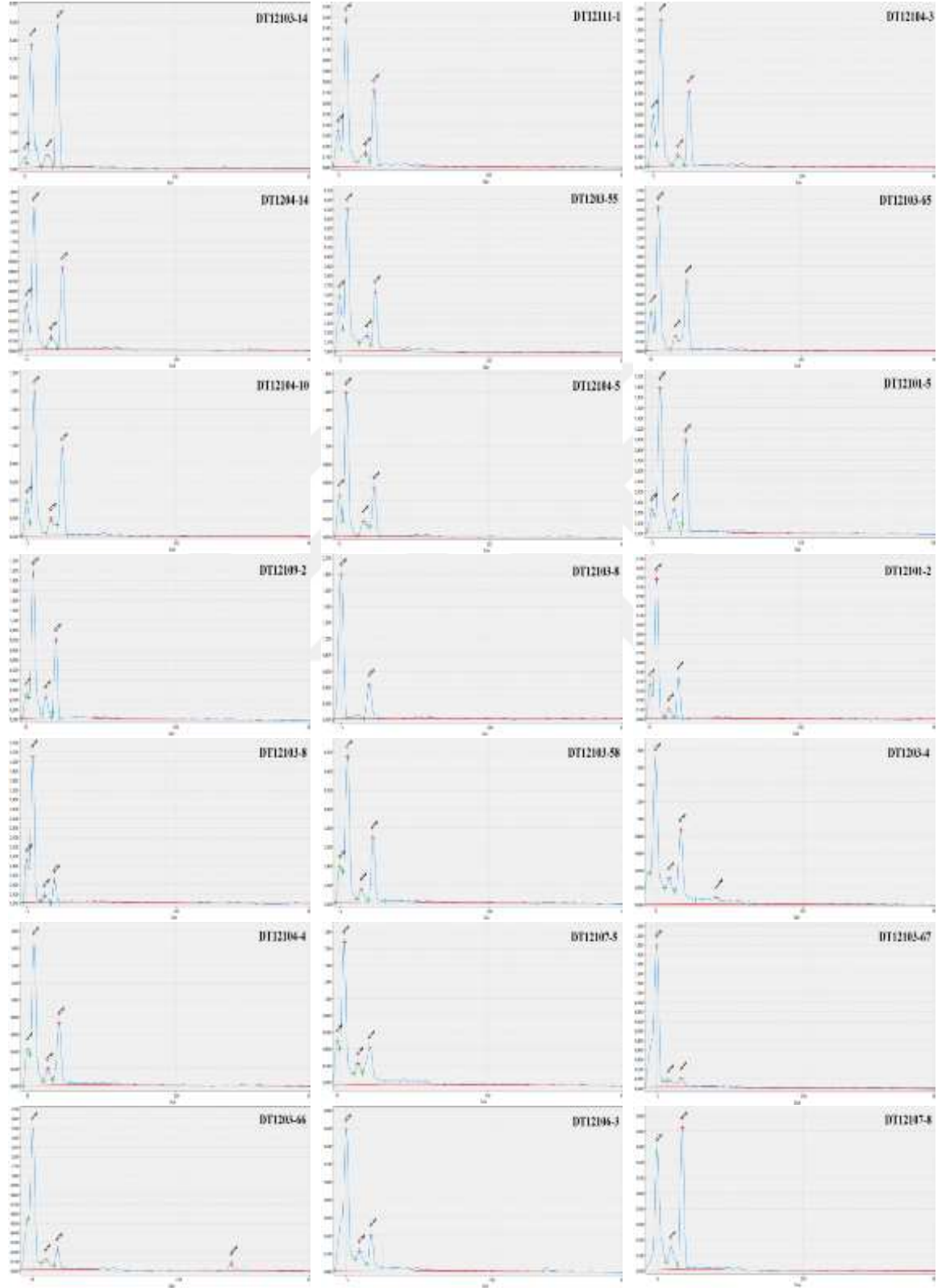
Ek-A (Devam) Islah hatlarının STM0003 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



Ek-A (Devam) Islah hatlarının STM0003 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



Ek-B Islah hatlarının RYSC3 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



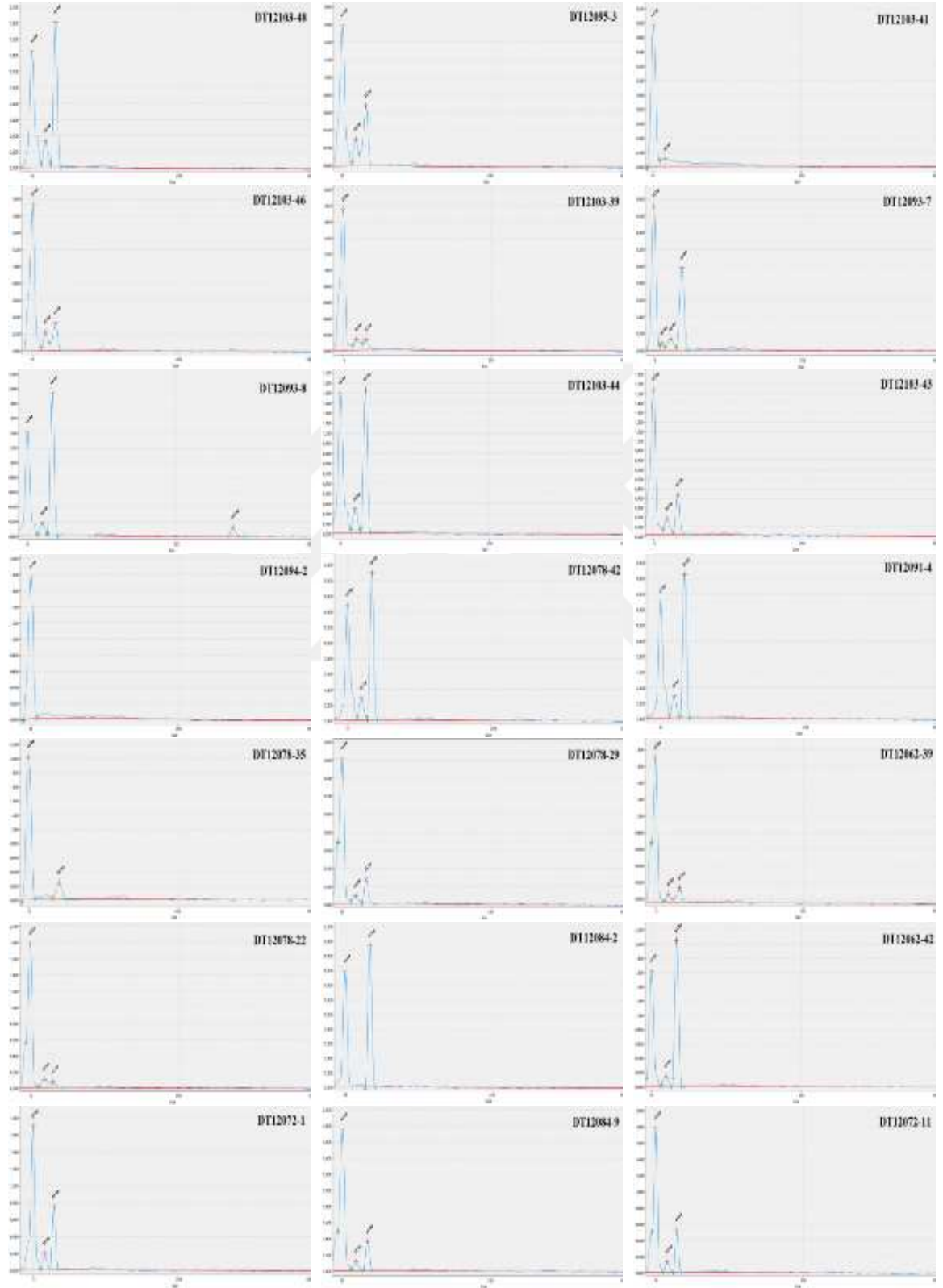
Ek-B (Devam) Islah hatlarının RYSC3 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



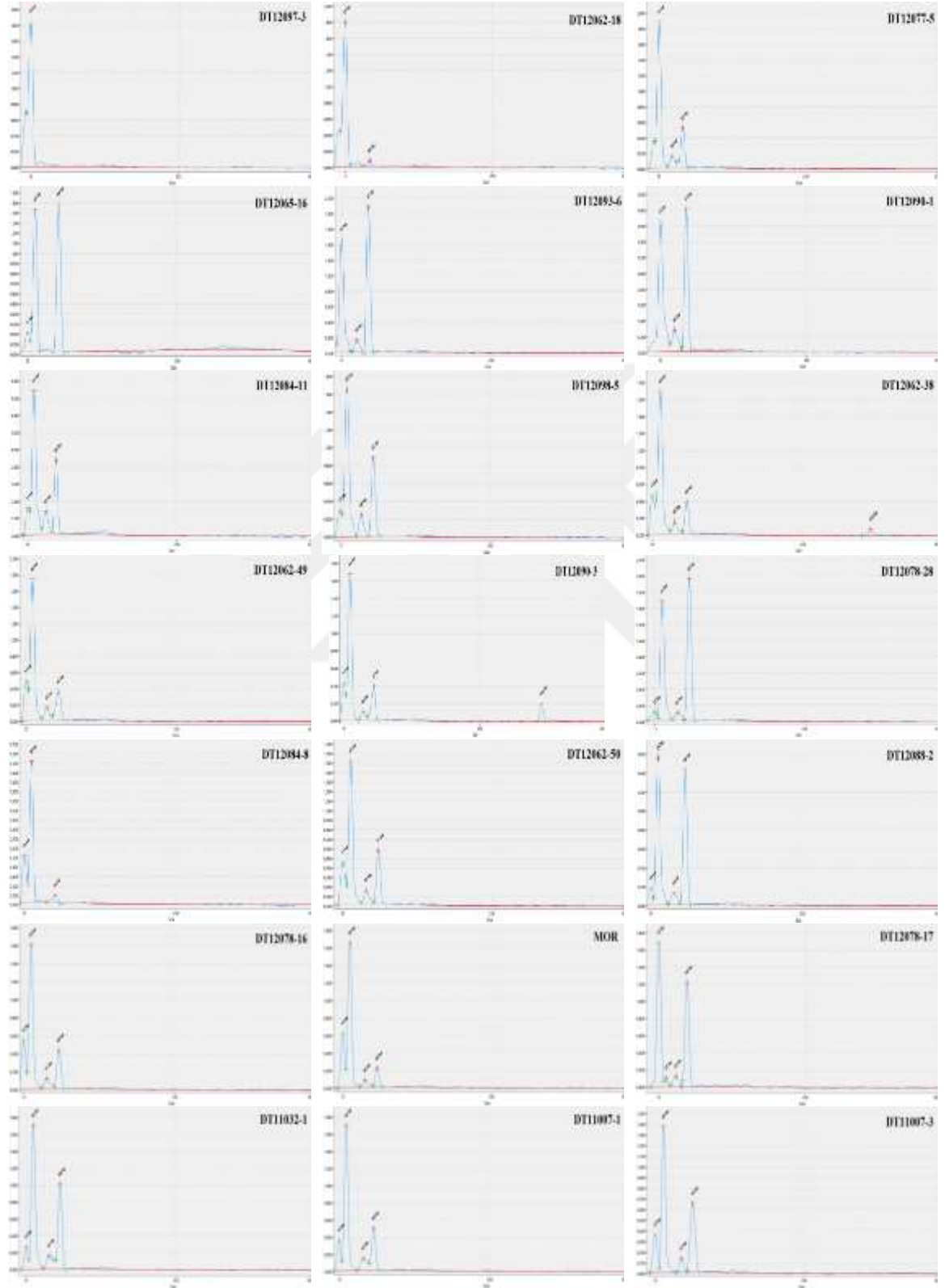
Ek-B (Devam) Islah hatlarının RYSC3 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



Ek-B (Devam) Islah hatlarının RYSC3 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



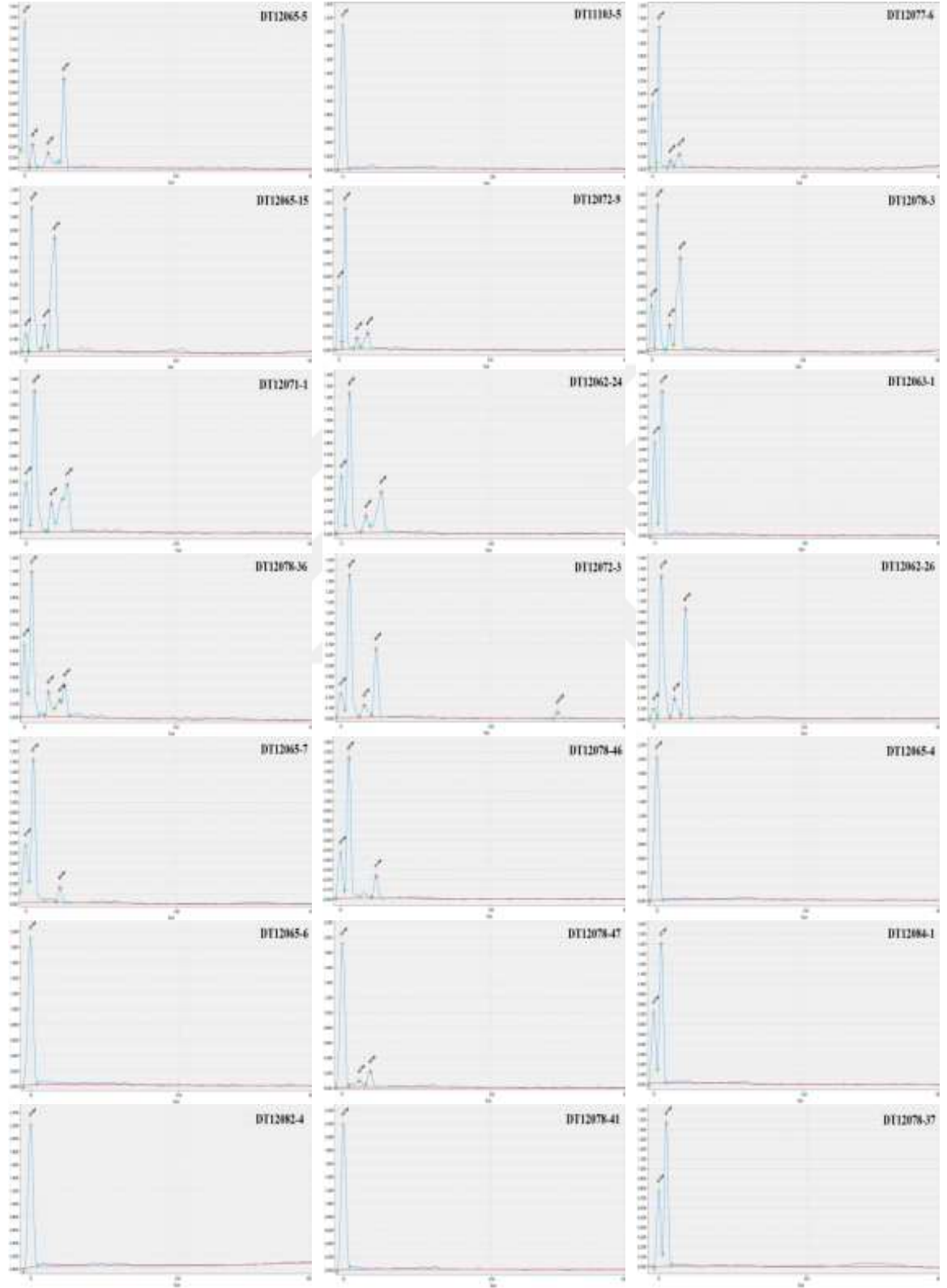
Ek-B (Devam) Islah hatlarının RYSC3 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



Ek-B (Devam) Islah hatlarının RYSC3 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



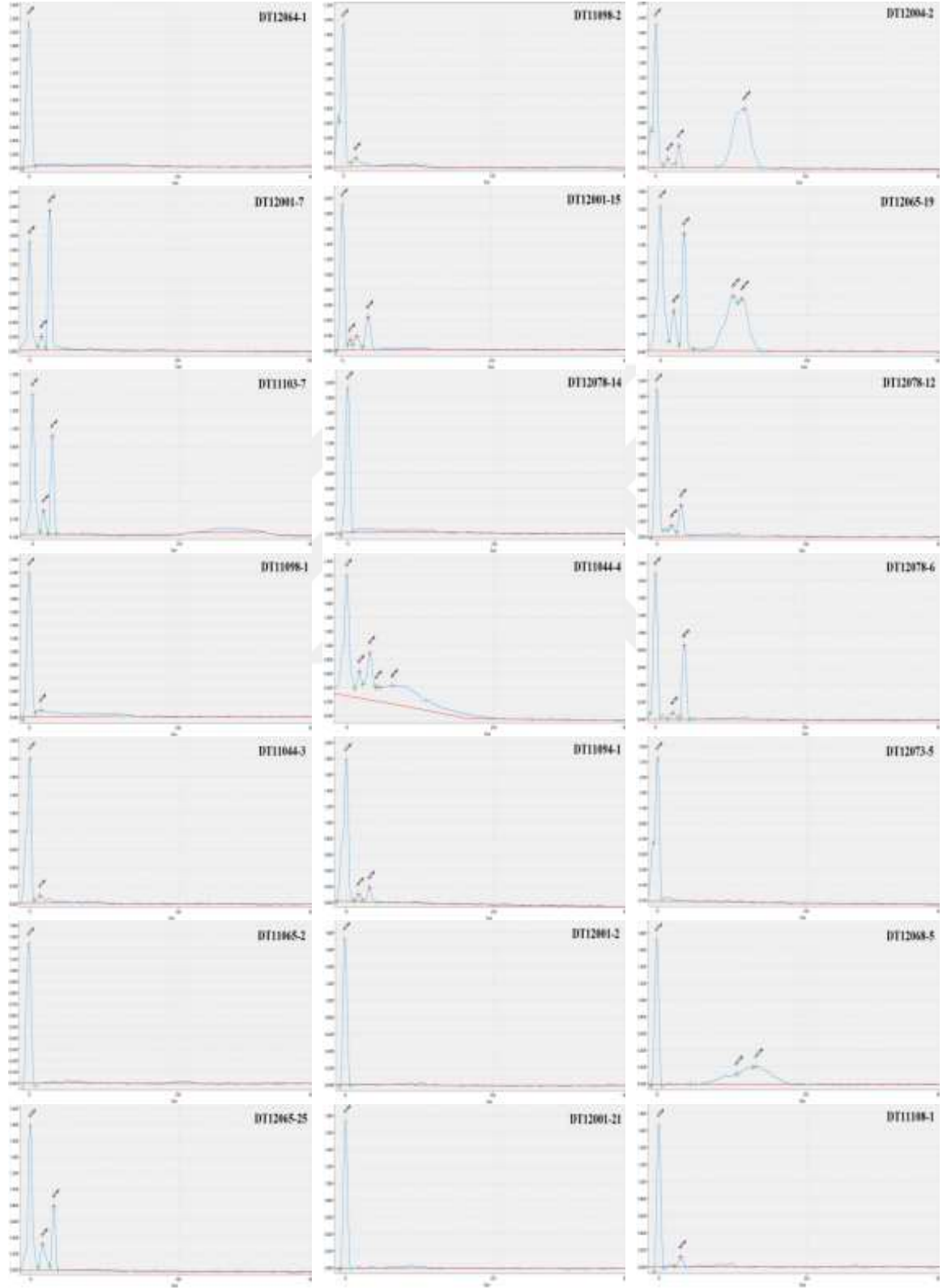
Ek-B (Devam) Islah hatlarının RYSC3 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



Ek-B (Devam) Islah hatlarının RYSC3 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



Ek-B (Devam) Islah hatlarının RYSC3 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



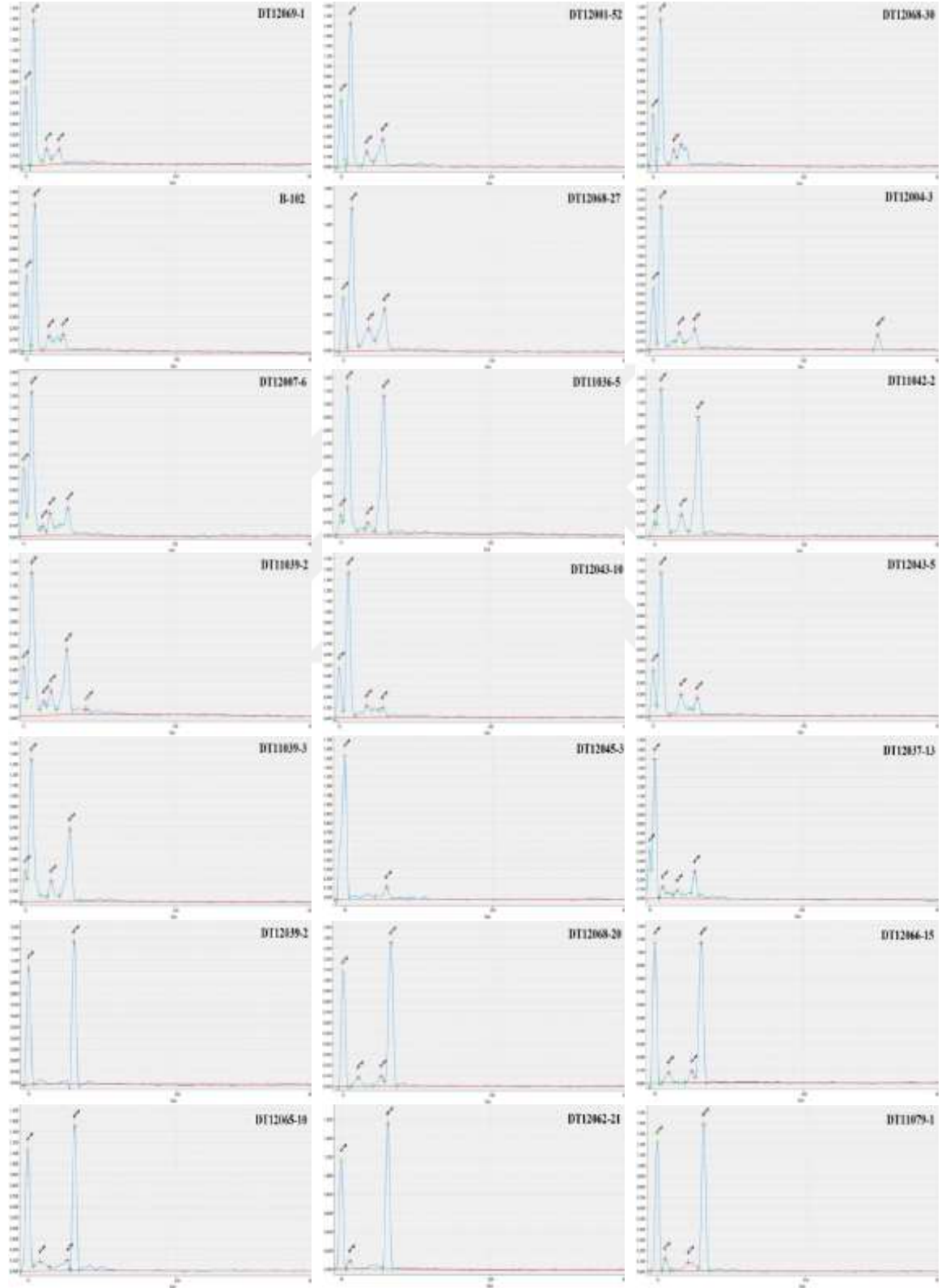
Ek-B (Devam) Islah hatlarının RYSC3 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



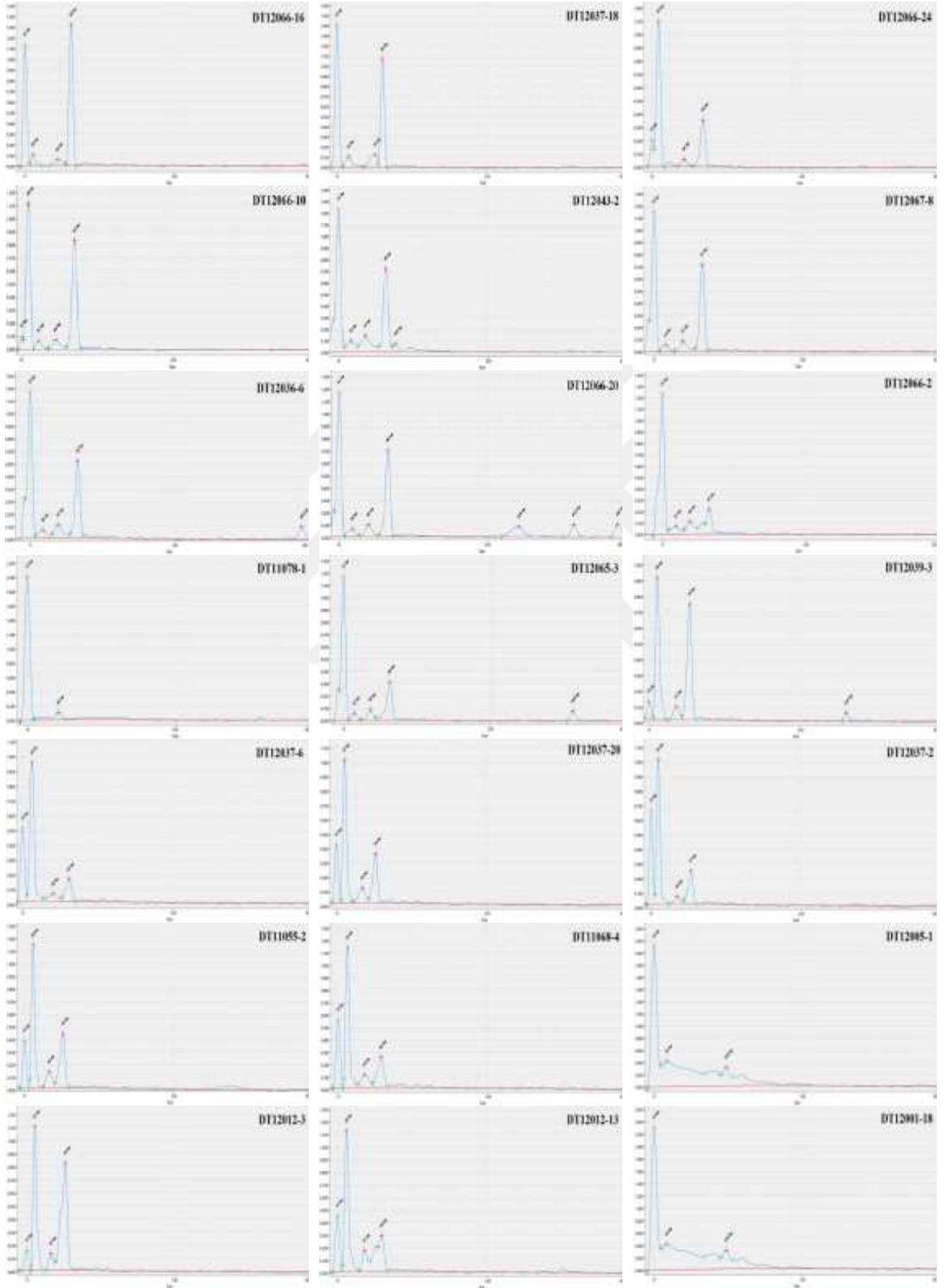
Ek-B (Devam) Islah hatlarının RYSC3 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



Ek-B (Devam) Islah hatlarının RYSC3 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



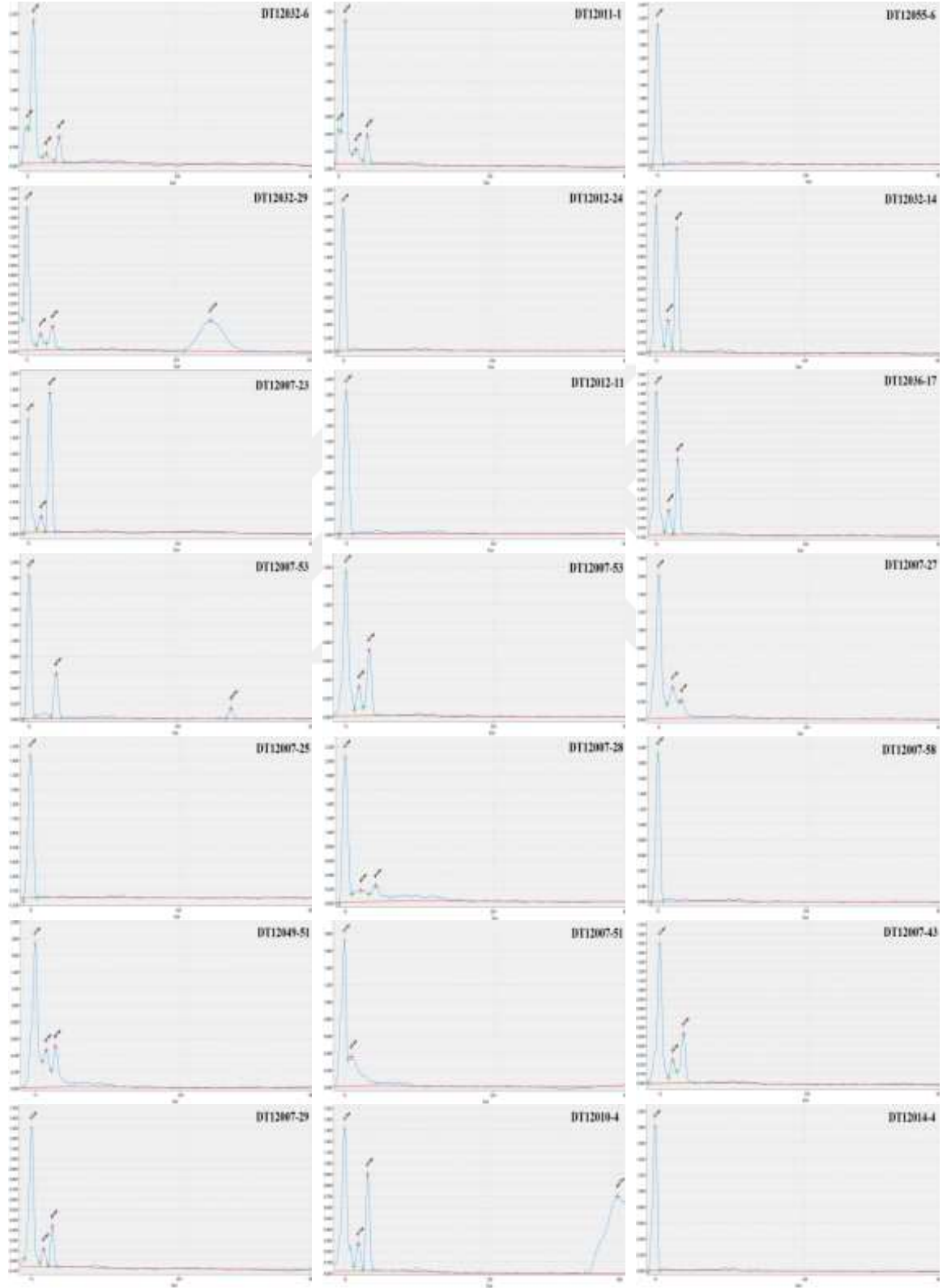
Ek-B (Devam) Islah hatlarının RYSC3 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



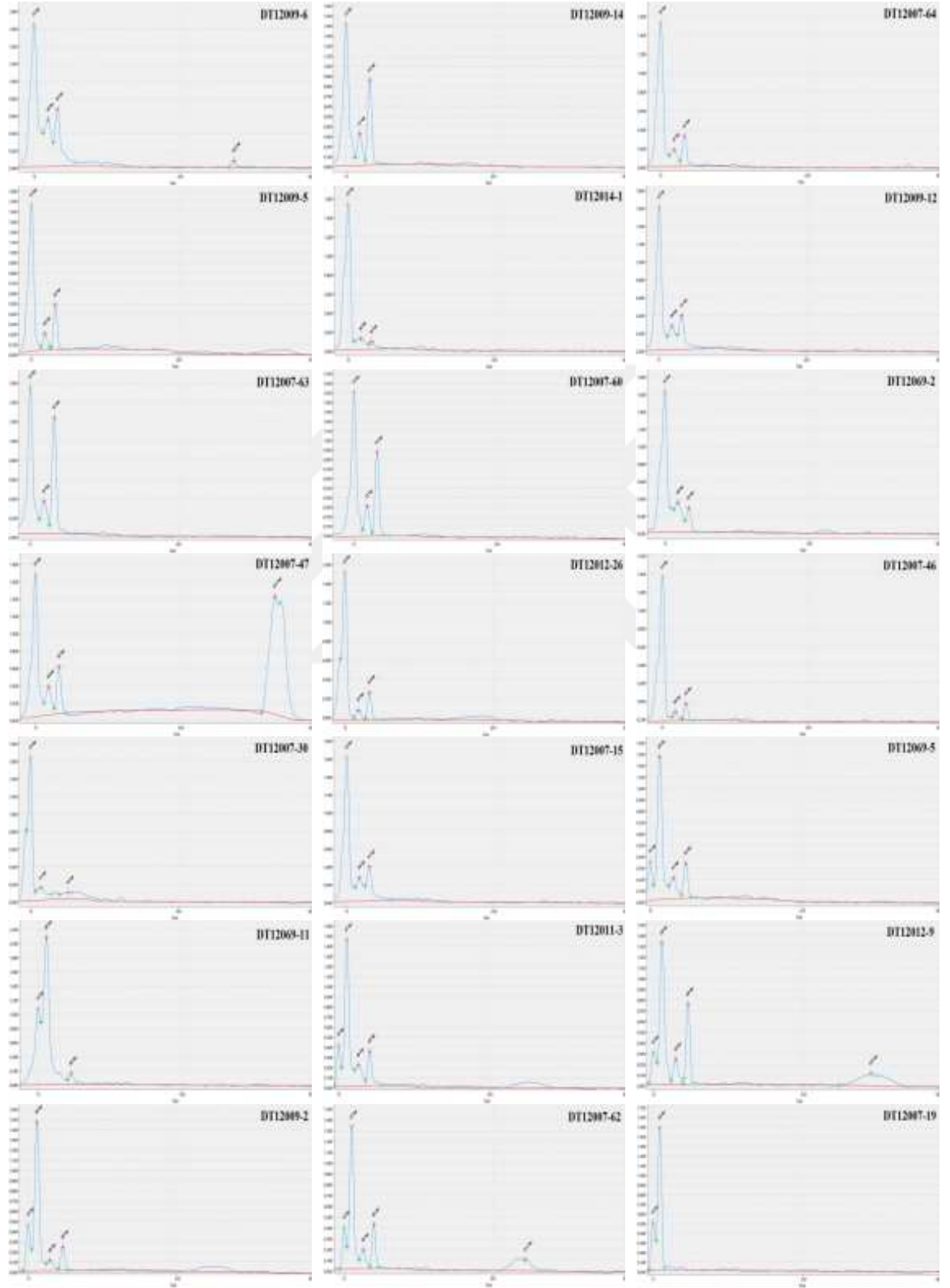
Ek-B (Devam) Islah hatlarının RYSC3 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



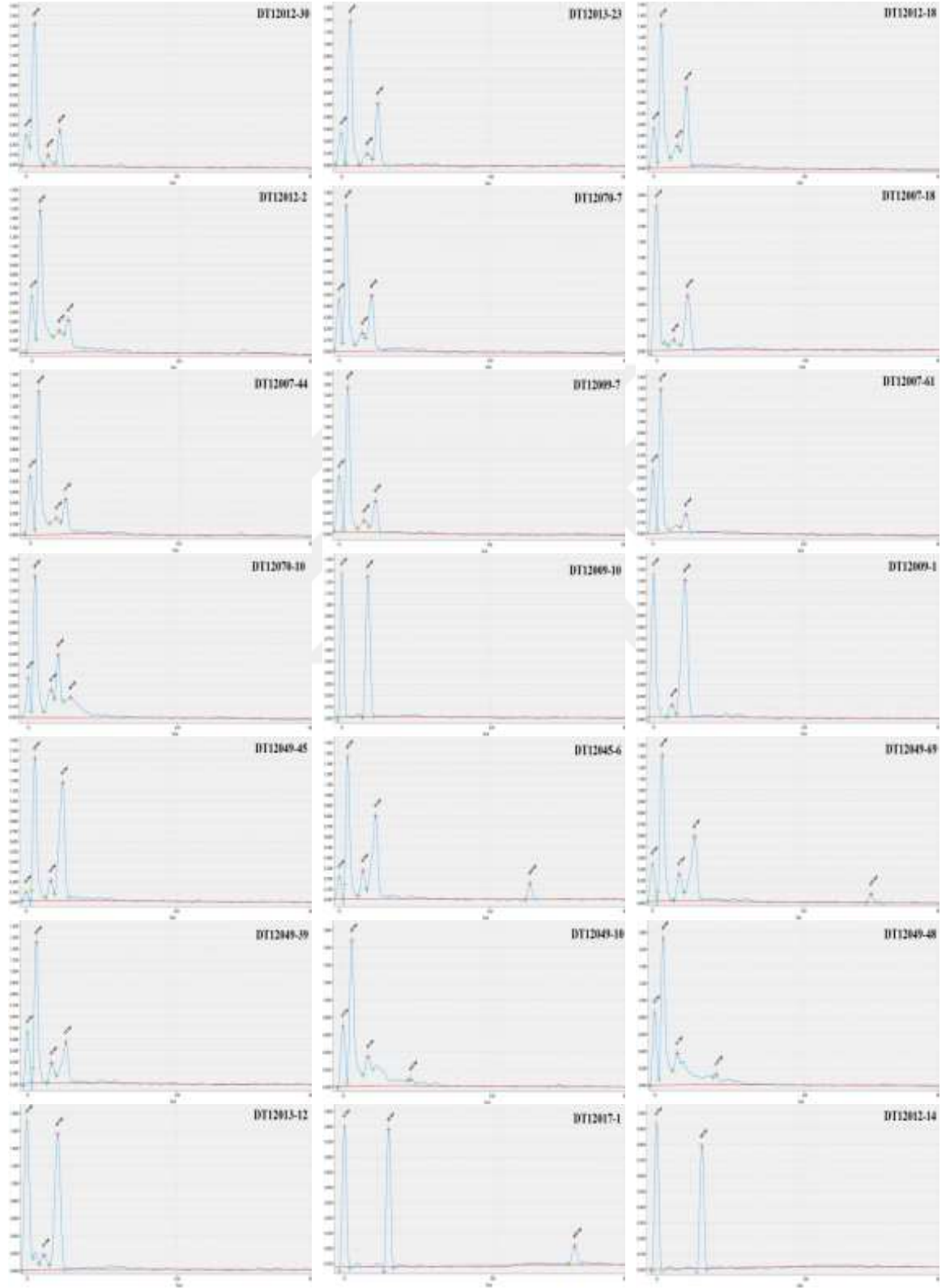
Ek-B (Devam) Islah hatlarının RYSC3 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



Ek-B (Devam) Islah hatlarının RYSC3 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



Ek-B (Devam) Islah hatlarının RYSC3 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



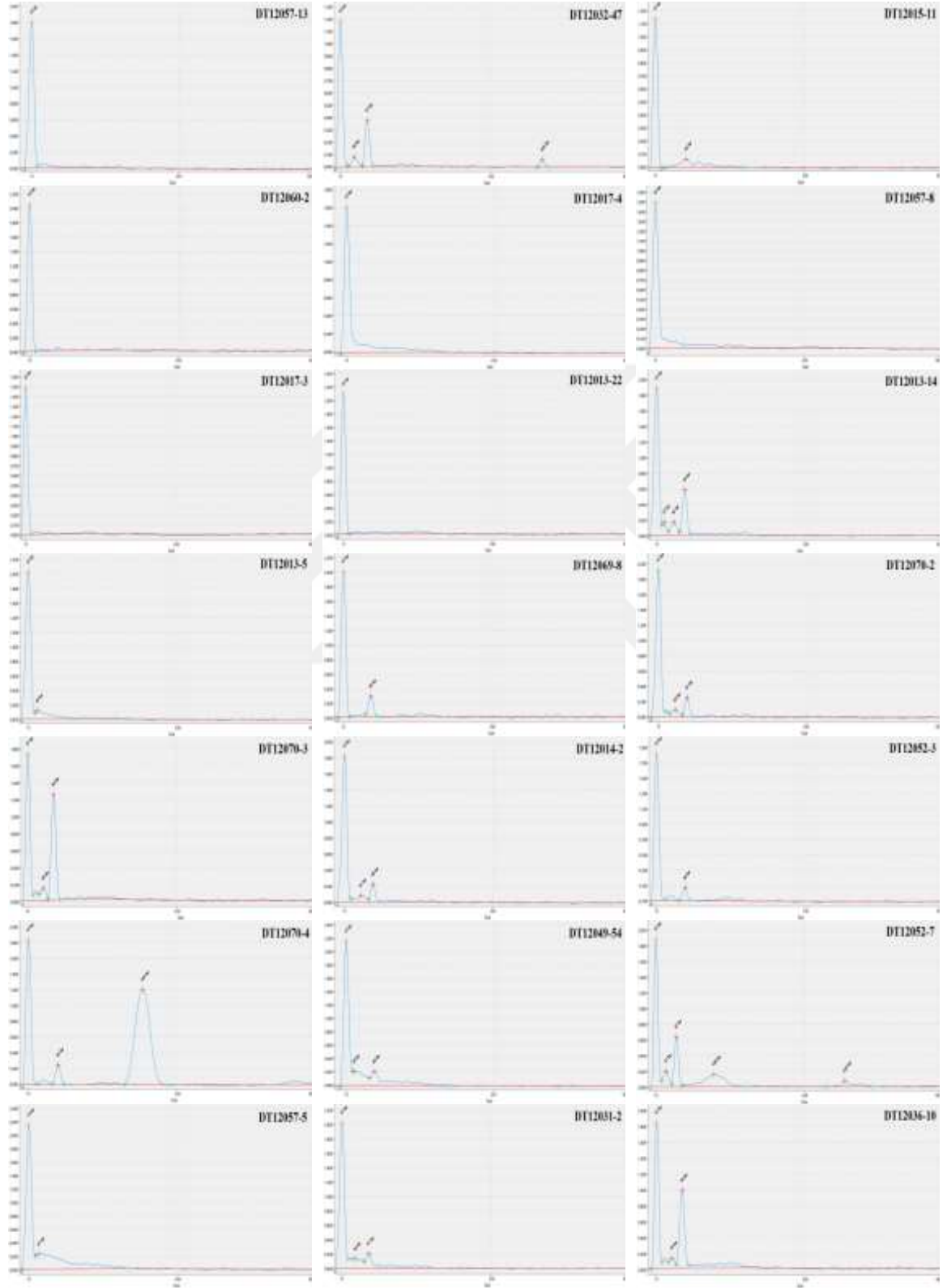
Ek-B (Devam) Islah hatlarının RYSC3 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



Ek-B (Devam) Islah hatlarının RYSC3 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



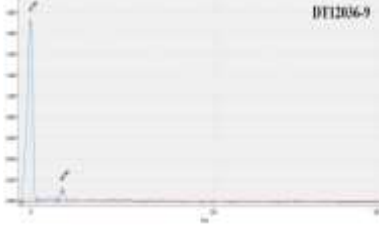
Ek-B (Devam) Islah hatlarının RYSC3 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



Ek-B (Devam) Islah hatlarının RYSC3 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



Ek-B (Devam) Islah hatlarının RYSC3 markörü ile taranmasının ardından elde edilen kapiler elektroforez analiz sonuçları



ÖZ GEÇMİŞ

Virdevs BALLI 1988 yılında Adana’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana’da tamamladı. 2010 yılında Çukurova Üniversitesi Karaisalı Meslek Yüksek Okulu Seracılık Bölümünden mezun oldu. 2010 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümüne başladı ve 2013 yılında mezun oldu. Aynı yıl Niğde Üniversitesi Tarımsal Genetik Mühendisliği Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.



