

## Bitkilerde Viral Etmenlere Karşı Genetik Dayanıklılık Mekanizmaları

Ayşe Çandar<sup>1</sup>, Semih Erkan<sup>2</sup>

### Özet

Bitki virüsleri, dünyada tarımsal ürünlerde hastalık yapan patojenlerin önemli bir grubunu oluşturmaktadır. Bitki virüs hastalıkları birim alandan sağlanan verimi düşürmek ve kaliteyi bozmak suretiyle önemli boyutlarda ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu ekonomik kayıpların önüne geçme çabaları yıllardan bu yana insanlığın uğraşı alanını oluşturmuştur. Bitkilerdeki virüs hastalıkları ile mücadelede kullanılacak etkin yöntemlerin az sayıda olması ise virüs hastalıklarını önlemenin önünde büyük bir engel oluşturmuş ve bitki dayanıklılık mekanizmalarını anlama çabalarını doğurmuştur. Bitkilerde virüslere karşı dayanıklılığın birçok mekanizması bulunmaktadır. Bu mekanizmalar; yapısal, biyokimyasal ve genetik dayanıklılık mekanizmalarıdır. Özellikle genetik dayanıklılık mekanizmaları hakkında çok sayıda araştırma yapılmıştır ve bu konu gelecek vadeden bir konudur. Çünkü virüs hastalıklarıyla mücadelenin en etkin yolu dayanıklı çeşit oluşturmak ve kullanmaktır. Bitkilerde antiviral savunmanın genetiği, dayanıklılık genlerinin çalışma mekanizması ve bitkilerde dayanıklılığın nasıl sağlandığı, dayanıklı çeşit bulma ve geliştirme girişimleri yönünden günümüzde öncelikle araştırılan konulardır. Bu makale kapsamında, yapısal ve biyokimyasal dayanıklılık mekanizmaları kısaca açıklandıktan sonra genetik dayanıklılık mekanizmaları, bu mekanizmaların bitkilerde doğal dayanıklılığı nasıl sağladığı ve virüslere dayanıklı transgenik bitki elde etme çalışmalarında nasıl kullanıldığı irdelenmektedir.

### GİRİŞ

Bilindiği gibi, virüsler gelişmeyi etkileyerek, verimi düşürerek ve kaliteyi bozarak bitkilere zarar vermektedir. Bazen bu zararlar ciddi kayıplara neden olabilmektedir. Örneğin, 1915 - 1916 yılları arasında Makedonya'da meydana gelen Sharka virüsü (*plum pox virus* = PPV) epidemisi, Bulgaristan ve Yugoslavya'da 16 milyon ağacın imhasına neden olurken, 1936-1946 yılları arasında Brezilya'nın San Paulo şehrinde turunçgil Tristeza Virüsü (*citrus tristeza virus* = CTV) epidemisi ise 7 milyon ağacın imhasına neden olmuştur (1). Türkiye'de virüs hastalıklarının zararı istatistiki olarak bilinmemekle birlikte Akdeniz Bölgesi'nde turunçgillerde ve Marmara Bölgesi'nde bağlarda virüs zararı oldukça fazladır (1). Ciddi kayıplara neden olan virüs

<sup>1</sup> Ziraat Müh., Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, 35100 Bornova-İzmir <sup>2</sup>  
Prof. Dr., Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, 35100 Bornova-İzmir.  
Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi: [aysecandar88@gmail.com](mailto:aysecandar88@gmail.com)

hastalıklarıyla mücadele de oldukça önemli bir konudur. Virüslerle mücadelede etkili yöntemlerin bulunmaması kültürel önlemler, çapraz koruma (cross protection) ve dayanıklı çeşit kullanma gibi mücadele yöntemlerini etkili kılmıştır. Özellikle son yıllarda çapraz koruma ile ilgili gelişen bir kısım endişeler araştırmacıları dayanıklı çeşitler geliştirmeye daha fazla yöneltmiştir. Dayanıklı çeşit kullanma günümüzde etkili mücadele yöntemi olarak kabul görmektedir.

Bitkiler doğada enfekte edilebilir ve bağışık olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Enfekte edilebilen bitkiler virüsün konukçusuken, bağışık bitkiler virüsün konukçusu değildir ve virüsler tarafından enfekte edilememektedir. Enfekte edilebilir bitkiler de kendi arasında hassas, dayanıklı, duyarlı ve tolerant olmak üzere dörde ayrılmaktadır. Duyarlı bitkiler, virüsün kolayca çoğalabildiği ve saldırdığı bitkiler; dayanıklı bitkiler, virüs saldırısını ve replikasyonunu sınırlandırmış bitkiler; aşırı duyarlı bitkiler, enfeksiyona şiddetli tepkiler veren bitkiler ve tolerant bitkiler, enfeksiyon sonrası az bir etki gözlenen ve bu zararın asla ekonomik zarar eşiğini geçmediği bitkilerdir (2). Bitkilerde dayanıklılık yapısal, biyokimyasal ve genetik dayanıklılık olmak üzere üç şekilde ortaya çıkmaktadır. Yapısal dayanıklılık, daha çok bitkinin fizyolojik olarak meydana getirdiği tepkileri ve olgun (ergin) bitki dayanıklılığını içermektedir. Örneğin, *Nicotiana glutinosa* adlı bitkideki tütün mozaik virüsü (*tobacco mosaic virus* = TMV) enfeksiyonuna karşı mantar tabakası oluşumu, sert çekirdekli meyve ağaçlarındaki nekrotik halka leke virüsü (*prunus necrotic ringspot virus* = PNRSV)'ne karşı ayırma tabakası oluşumu (3), yine aynı enfeksiyona karşı zambak birikmesi (4) ve *Nicotiana sylvestris* (1,3)- $\beta$ -glucanase mutantlarında tütün nekroz virüsü (*tobacco necrosis virus* = TNV)'ne karşı kalloz birikmesi (5) virüsün bitkide hastalıklı bölgeden sağlıklı bölgeye yayılmasını engelleyen yapısal dayanıklılık mekanizmalarıdır. Olgun bitki dayanıklılığı ise erginlik çağına gelmiş bitkilerin virüslere karşı duyarsız hale gelmesine dayandırılmaktadır. Örneğin, patates bitkilerinin yaşlı yapraklarında ribozimlerin sayısının az olması nedeniyle virüslere daha dayanıklı olmasına (6) ve olgun bitkinin dış görünüşünün tüylü olması nedeniyle de stilet kaynaklı virüslere dayanıklı olmasına neden olmaktadır (7).

Biyokimyasal dayanıklılık, enfeksiyon öncesi mevcut biyokimyasal maddeler ve enfeksiyon sonrası oluşan maddeler olmak üzere iki şekilde ortaya çıkmaktadır. Enfeksiyon öncesi varolan biyokimyasal maddelerin en önemlileri virüs biyosentezini engelleyen 2RIP (2 Ribozom inaktive edici protein) ve insektisidal lektinler gibi lektinler ve *Phytolacca* antiviral proteinleri gibi inhibitörlerdir. Ayrıca, virüs biyosentezinde gerekli enerji için nükleosit trifosfat, protein sentezi için konukçu enzimleri ve viral nükleik asit sentezi için konukçu hücre zarına bağlı bir proteinin yetersizliği de virüslere biyokimyasal dayanıklılık sağlamaktadır. Enfeksiyon sonrası oluşan biyokimyasal moleküller, aşırı duyarlılık sonucu meydana gelen salisilik asit, reaktif hidrojen türevleri (ROS) ve nitrit oksit (NO)'tir. Bu moleküller dokularda dayanıklılığı başlatıcı dayanıklılık sinyallerini oluşturmaktadır (7).

Anlatılan yapısal ve biyokimyasal dayanıklılık mekanizmalarından farklı olarak genetik dayanıklılık nesilden nesile aktarılabilirdiği, ıslah ve genetik mühendisliği çalışmalarıyla dayanıklı bitki elde etme programlarında kullanılabildiği için oldukça önemlidir.

## Virüslere Karşı Dayanıklılığı Sağlayan Genler

Bitki virüslerine karşı dayanıklılık, *yatay (horizontal)* ve *dikey (vertikal)* dayanıklılık olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Bunlardan yatay dayanıklılığa *kantitatif dayanıklılık* da denmekte ve çok gen tarafından ifade edilen virüse özel olmayan dayanıklılık olarak tanımlanmaktadır. Dikey dayanıklılık ise, tek gen aracılığıyla sağlanan dayanıklılıktır. Tarlada dayanıklılık, yatay ve dikey dayanıklılığın eşzamanlı ifadesi ile ortaya çıkmaktadır (2). İster yatay ister dikey dayanıklılık olsun dayanıklılığı kontrol eden genler, genetik yapısı bakımından dominant ve resesif özellikte olmak üzere iki şekilde sınıflandırılmaktadır.

### Dominant Dayanıklılık Genleri

Virüslere dayanıklılık sağlayan dominant genler N geni ve R genleri şeklinde birçok bitkide tanımlanmıştır (Çizelge 1). Dominant genlerden N geni, ilk olarak *Nicotiana glutinosa*'da keşfedilmiş olup, bitkide *tütün mozaik virüsü (TMV)*'ne karşı HR (Hipersensitif Reaksiyon= Aşırı Duyarlılık) ile ilişkili dayanıklılığı yöneten bir genidir. N geni, HR sonucunda virüsün yayılmasını nekrotik alanlarla sınırlandırdığı için nekrozun baş harfi N ile adlandırılmıştır. Beş ekson ve dört introndan oluşan bu gen; bir Toll İnteleukin Receptor (TIR), bir nükleotit bağlanma bölgesi (NBS) ve lösince zengin tekrarlar (LRR)'dan oluşan bir proteini kodlamaktadır. Kodlanan bu protein, plazma zarındaki dış hücrelerden sinyali alıp taşıyarak hücre içindeki TMV'nü tanımakta ve HR'u başlatmaktadır (8).

Çizelge 1. Virüslere dayanıklılık sağlayan dominant genler (9)  
(Andrew ve ark., 2007'den değiştirilmiştir)

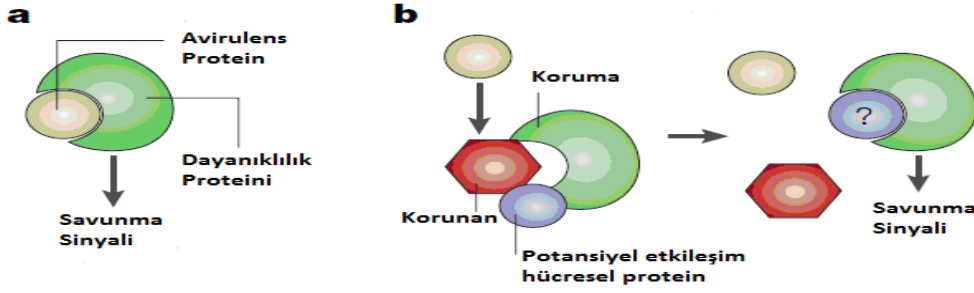
Gen Virüs	avr *	Bitki Türü
N Tobacco mosaic virus (Tobamovirus)	Replikaz/Helikaz	Tütün
Tm2 <sup>2</sup> Tobacco mosaic virus (Tobamovirus)	Hareket Proteini	Domates
Rx1 Potato virus X (Potexvirus)	Kılıf Proteini	Patates
Rx2 Potato virus X (Potexvirus)	Kılıf Proteini	Patates
Y-1 Potato virus Y (Potyvirus)	----- +	Patates
Sw5 Tomato spotted wilt virus (Tospovirus)	Hareket proteini	Domates
Rsv1 Soybean mosaic virus (Potyvirus)	-----	Soya Fasulyesi
RT4-4 Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)	2a geni	Fasulye
HRT Turnip crinkle virus (Carmovirus)	Kılıf Proteini	<i>A. thaliana</i>
RTM1 Tobacco etch virus (Potyvirus)	-----	<i>A. thaliana</i>
RTM2 Tobacco etch virus (Potyvirus)	-----	<i>A. thaliana</i>
RCY1 Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)	Kılıf Proteini	<i>A. thaliana</i>

\* : Viral Kaynaklı Avirülens Belirleyicisi + : Bilinmiyor

Özellikle dayanıklı konukçulardan bahsedildiğinde dayanıklı bitkileri enfekte edemeyen virüs izolat veya ırkları avirülent, buna karşın dayanıklılığın üstesinden gelerek bitkiyi hastalandırmayı başaran virüs izolat ve ırkları virülenttir.

Bilindiği gibi, HR (Hipersensitif Reaksiyon= Aşırı Duyarlılık), dayanıklılık genlerinin Avr (Avirülens) genlerini tanımasıyla birlikte savunma sinyalinin oluşması sonucu başlamaktadır. Tanıma proteinin üç boyutlu yapısıyla ilgilidir. Tanıma olayının nasıl gerçekleştiğini açıklamak için araştırmacılar, iki önerme ileri sürmüşlerdir (Şekil 1). Bu önermelerden ilki reseptör-ligand modeli, diğeri koruma hipotezidir. Reseptör ligand modelinde (Şekil 1a) dayanıklılık genlerinin Avr proteinlerini tanımasıyla savunma

sinyali oluşmakta ve böylece dayanıklılık başlamaktadır. Fakat bu model, tüm R-Avr çiftlerine uymadığı için terk edilmiş ve koruma hipotezi geliştirilmiştir. Koruma hipotezi, koruma ve korunanlar arasında gerçekleşmektedir (Şekil 1b). Burada korunanlar, enfeksiyon için patojen tarafından gereksinim duyulan konukçu hücrel proteinleri; koruma ise, dayanıklılık proteinleri (N veya R proteinleri)'dir. Hipoteze göre, Avr proteininin korunanlarla potansiyel etkileşimi sonucunda oluşan hücrel protein, korumayı tanımakta ve savunma sinyali oluşmaktadır. Koruma hipotezi, birçok sisteme uyduğu için günümüzde geçerli olan bir mekanizmadır.



Şekil 1. Dayanıklılık genlerinin Avr genlerini tanınması üzerine ileri sürülen önermeler a) Reseptör-ligand modeli, b) Koruma hipotezi (10) (Sooassar ve ark., 2005'den değiştirilmiştir)

Dayanıklılık sağlayan R genleri isimlerini dayanıklılık anlamına gelen “Resistance” kelimesinin baş harfinden almıştır. Genellikle R genleri, HR ve SAR (*Sistemic Acquired Resistance*= Sistemik kazanılmış dayanıklılık) ile dayanıklılık sağlarken, bunlardan RTM1 ve RTM2 genleri tütün yanıklık virüsü (*tobacco etch virus*= TEV)'nün uzak mesafelere yayılmasını engelleyerek dayanıklılık sağlaması bakımından farklılık göstermektedir. HR ile dayanıklılık sağlayan R genleri, virüsü nekrotik lezyonlarla sınırlamakta iken SAR ile dayanıklılık sağlayan R genlerinin sağladığı dayanıklılık bağışıklık şeklinde uzak dokularda meydana gelmektedir. Bir R geni olan Rx geni, bitkide patates X virüsü (*potato virus x* = PVX)'ne karşı dayanıklılık sağlayan bir gendir ve üç ekson içermektedir. Genin kodladığı Rx proteini, 16 tekrarlı LRR ve bir NBS içermektedir (10). Rx proteininin N proteininden farkı ise protein dimerizasyonunda rol oynayan amino ucunda fermuar benzeri bir lösün domaini içermesidir (2). R genlerinin neden olduğu HR'da Avr proteinlerini tanıyarak savunma sinyalinin oluşturulması N genlerle aynı modellerle açıklanabilmektedir.

## Resesif Dayanıklılık Genleri

Resesif dayanıklılık, diğer patojenlere göre bitki virüslerine ve bitki virüsleri içinde de Potyvirüslere karşı daha sık biçimde görülmektedir (11). Resesif dayanıklılık genleri doğal resesif genler ve mutantlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Çizelge 2). Mutant genler, virüs enfeksiyonu için gerekli konukçu faktörlerinin mutasyonu sonucunda oluşmakta ve resesif kalıtsal dayanıklılıkla sonuçlanmaktadır.

Çizelge 2'de, farklı virüslere karşı tanımlanmış birçok resesif R geni bulunduğu görülmektedir. Dominant R genlerinin tersine, bazı resesif R genleri tek hücre seviyesinde fonksiyon göstermekte veya hücreden hücreye hareketi etkilemektedir. Bugüne kadar tanımlanmış resesif R genlerinin yarısından fazlası, bitki virüslerinin en

geniş ve belki de ekonomik olarak en yıkıcı familyası olan Potyviruslere karşı tanımlanmıştır (12).

Çizelge 2. Virüslere dayanıklılık sağlayan dominant genler (9) (Andrew ve ark., 2007'den değiştirilmiştir)

	Virüs	Bitki Türü
<u>Doğal Genler</u>		
pvr 1, pvr 2 <sup>1</sup> pvr2 <sup>2</sup> +pvr 6	PVY, TEV, Potato vein mottling virus (PVMV)	Biber
pot-1	PVY, TEV	Domates
sbm 1	Pea seed borne mosaic virus	Bezelye
mo 1 <sup>1</sup> , mo1 <sup>2</sup>	Lettuce mosaic virus	Marul
	Barley mild mosaic virus	Arpa
rym 4/5	Barley yellow mosaic virus , Barley yellow mosaic virus 2	
rymv 1	Rice yellow mottle virus	Çeltik
nsv	Melon necrotic spot virus	Kavun
<u>Mutantlar</u>		
At- eIF4E 1	Clover yellow vein virus	<i>A.thaliana</i>
At- eIF(iso) 4E	Turnip mosaic virus, LMV, TEV	<i>A.thaliana</i>
At- eIF4E 1(cum 1)	CMV	<i>A.thaliana</i>
At- eIF4G (cum 2)	CMV, TCV	<i>A.thaliana</i>

## Antiviral Bir Mekanizma Olan Gen Sessizleştirme (Susturma)

Gen sessizleştirme (Gene Silencing), bitkilerde virüslere karşı geliştirilmiş doğal bir savunma mekanizmasıdır. Bitkilerde doğal olarak bulunmasının yanı sıra *in vitro* olarak da gerçekleştirilebilmekte ve bu konu üzerinde yapılan çalışmalar giderek yaygınlaşmaktadır.

ssRNA veya dsRNA'ların dicer ile kesilmesi sonucu oluşan 18-25 nükleotit uzunluğunda kodlama yapma kabiliyeti olmayan ve henüz fonksiyonları tam olarak bilinmeyen dsRNA yapısındaki küçük RNA'ların rol oynadığı bu mekanizmaya genel anlamda *gen sessizleştirilmesi* adı verilmektedir (13). Gen sessizleştirme bitkilerde genlerin yapısına bağlı olarak birkaç şekilde meydana gelmektedir. Bunlar transkripsiyon sırasında gen sessizleştirme (TGS), transkripsiyon sonrası gen sessizleştirme (PTGS) ve DNA metilasyonudur. Bahsedilen gen sessizleştirme mekanizmalarından bitkilerde en yaygın görüleni ise PTGS'dir.

PTGS mekanizması sitoplazmada benzer içgen RNA'leri ve transgen RNA'leri hedef almaktadır. PTGS transgenlerin kopyalanmasının devamı ile ilişkilendirilmektedir. PTGS mekanizması sitoplazmada RNA virüsleri tarafından tetiklenebilmektedir. Bu mekanizma genellikle transgenik ve virüs enfekteli bitkilerde siRNA ürünü tarafından yürütülmektedir. Viral genomik RNA ile enfekteli bitki hücresi RNA bağlı RNA polimeraz (RdRp) enzimi üretmektedir. Bu RdRp enzimi bir kalıp RNA kullanarak dsRNA'yı sentezlemektedir. Bu RNA dicer olarak bilinen RNase III enziminin üretimi için substrat sağlamaktadır. Dicer enzimi ise dsRNA ile kontak kurarak dsRNA'yı 18-

25 nükleotit boyutundaki küçük parçalara ayırmaktadır. Bir adım sonrasında oluşan siRNA'nın rehber olarak adlandırılan iplikçiklerinden biri tamamlayıcı olarak RISC (RNA Induce Silencing Complex) ile birleşmektedir. siRNA'nın diğer iplikçığı RISC'den ayrılır ve degrade olur. RISC'in bir bileşeni de özel Argonaut (Ago) proteindir. Özel protein Argonaut sadece RISC'in protein parçasını oluşturan bir proteindir. Bu proteinler bitkilerin doğal yapısında mevcut bulunmaktadır. Daha sonra RISC hedef viral RNA ile interaksiyona girer. Ago proteini RISC ile birlikte interaksiyona girdiği hedef viral ssRNA'yı keser. RISC ile siRNA komponenti parçalanan hedef RNA'ya yapışırlar. Bu durumda viral RNA'nın yapısı değişir. Yeni oluşan RNA'nın protein sentez dizisi tamamen değişir ve hedef RNA sessizleştirilmiş olur. Bu şekilde mekanizma tamamlanmakta ve hedef viral RNA işlevini kaybetmektedir (13).

## **Virüslere Dayanıklı Bitkiler Elde Etme Stratejileri**

Bitkilerdeki virüslere karşı çeşitli dayanıklılık mekanizmalarının ve bu mekanizmaları yöneten genlerin ortaya koyulmasıyla birlikte bitkilere gen aktararak dayanıklılık sağlama çabaları popüler hale gelmiştir. Araştırmacıları virüslere dayanıklı transgenik bitki elde etmeye iten nedenler ise geleneksel yöntemler kullanılarak virüslerden korunmanın uzun zaman alıcı ve pahalı olmasıdır. Virüslere karşı birçok transgenik dayanıklılık mekanizması bulunmakta ve patojenden türetilen dayanıklılık ve patojen hedefli dayanıklılık olarak iki grup altında toplanmaktadır.

### **Patojenden Türetilen Dayanıklılık**

Sanford ve Johnston (14) tarafından tanımlanan "patojenden türetilmiş dayanıklılık" kavramı, patojenin konukçuyla her bir interaksiyonu sırasında yaşam döngüsünü tamamlamak için gerek duyulan temel bileşen ve fonksiyonları yerine getirememesi fikri üzerine kuruludur (15). Bu dayanıklılık tipinde patojen kaynaklı ürünler (kılıf proteini, antisense RNA, satellite RNA vb.) kullanılmaktadır. Aktarılan ürüne göre çeşitli dayanıklılık mekanizmaları elde edilmektedir.

### **Protein Kılıfa Dayalı Çapraz Koruma**

Çapraz korumanın anlamı bir virüsün uyarılan ikinci bir virüsün etkilerini önleme veya inhibe etme yeteneğidir. Eğer, bir bitkisel ürünün duyarlı ırkları, bir virüsün ılımlı ırklarıyla inokule edilirse, duyarlı ırk daha virülent ırklara karşı dayanıklılık geliştirmektedir. İlk olarak tütün bitkisine TMV'nün kılıf proteini aktarıldığında virüse dayalı çapraz korumada olduğu gibi bir sonuç elde edilmişlerdir (16). Bundan sonra daha birçok virüs grubu üzerinde denenen benzer çalışmalar yürütülmüş ve protein kılıfa dayalı dayanıklılığı destekleyen sonuçlar bulunmuştur. Protein kılıfa dayalı dayanıklılık birçok sistemde enfeksiyon başlangıcındaki virüs replikasyonunun inhibe edilmesiyle ilişkilidir. Bu tip dayanıklılığın virüs yaşam döngüsündeki ilk basamağın engellenmesiyle, inokule edilmiş yapraklarda enfeksiyon bölgelerinin sayısının azalmasıyla ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu olay TMV çapraz korumasının saldırgan virüs RNA' sının protein kılıfla kaplanması önleyerek virüsün koruyucu kılıf proteininden kaynaklandığını göstermektedir. Kılıf proteine dayalı dayanıklılıkla ilgili birçok sistemin tek bir kılıf protein ile plus-sense RNA virüslerine karşı

yönlendirildiği rapor edilmiştir. Bu uygulamalar tütün, domates, patates, alfalfa, kavun, şekerpancarı, kabak, çeltik, mısır gibi birçok üründe kullanılmaktadır (17).

Halen, turunçgillerde (*turunçgil tristeza virüsü*), papayada (papaya halkalı leke virüs) ve sera domateslerinde (TMV) kullanılmakta olan klasik çapraz korunma yöntemi yerine genetik mühendisliği teknikleri ile elde edilmiş bitkileri kullanmak daha avantajlıdır. Çünkü zayıf virüs ırkı ile bitkilerin inoküle edilmesi yoğun laboratuvar ve sera çalışması gerektirdiği gibi sınırlı populasyon sayısı ile çalışmayı gerektirmektedir. Daha ötesi zayıf ırk bazı ters etkilenmelere neden olabilir. Örneğin ırk mutasyonla şiddetli ırka dönüşebilmektedir (18).

### **Yapısal Olmayan Proteine Dayanıklılık**

Yapısal olmayan proteinler replikaz enzimi, hareket proteini ve proteaz enzimi olduğu için dayanıklılık mekanizmaları da bu proteinlerle ilişkili olmaktadır.

Replikaza Dayalı Dayanıklılık: Virüsler replikasyon için gerekli olan yapısal olmayan proteinleri kodlamaktadır. Son zamanlarda yapısal olmayan replikaz proteinlerin birkaçı, transgenik bitkilerde ifade edildiği zaman virüs enfeksiyonuna karşı yüksek bir dayanıklılık sağlamak için bulunmuştur (17). Bu olayı ilk olarak, Golemboski ve ark.(19), TMV'nün 54kDa'luk kısmıyla eksprese edilmiş 54 kDa olan tütün bitkisinin TMV enfeksiyonuna karşı gösterdiği oldukça yüksek dayanıklılığın nedeninin transgenik tütündeki 183 kDa'luk replikaz olduğunu bulmuştur. Bu çalışmada 54 kDa' luk mRNA transkriptleri transgenik bitkilerde saptanmış olmakla birlikte 54 kDa' luk protein saptanamamıştır. Homolog viral iplikçikler sınırlandırılmış ve ilişkili virüse karşı çokça etkili olmamıştır. Farklı virüslere karşı (PVX, PVY, CMV, Bezelye Erken Yanıklık Virüsü vb.) benzer replikaza dayalı dayanıklılık ortaya konmuştur (15). Replikaza dayalı dayanıklılığın mekanizması bilinmemekle birlikte kusurlu hıyar mozaik virüsü (CMV) proteininin, kodlanmış virüs replikazının birikmesini önlemek veya birikmiş replikazın fonksiyonunu inhibe etmek suretiyle dayanıklılıkta rol oynadığı düşünülmektedir (20).

Hareket Proteinine Dayalı Dayanıklılık: Bitki virüsleri genellikle enfeksiyon bölgelerinden komşu hücrelere plazmodezmatlardan türe özgü hareket proteini yardımıyla geçebilmektedir. Hareket proteinine dayalı dayanıklılık viral enfeksiyon sürecini engelleyen yeni bir stratejidir. Sadece fonksiyonsuz hareket proteinleri üretildiğinde koruma gözlenmiştir. Dayanıklılığın belirli bir spektrumu etkisiz hareket protein genleri kullanılarak gerçekleştirilebilmiştir. Örneğin, işlevsiz hale getirilen bir TMV hareket proteiniyle eksprese edilmiş bitkiler *Tobravirus*, *Nepovirus*, *Alfamovirus*, *Caulimovirus* ve *Cucumovirus* gibi farklı gruplara ait virüslerden korunmuştur (15).

Proteaza Dayalı Dayanıklılık: Potyvirusler, virüsün kodladığı proteazlar aracılığıyla bağlanan bir poliprotein ile genlerini eksprese ederler. Tütün damar bantlaşma virüsü (*tobacco vein banding virus* = TVBV) veya patates Y virüsü (*potato virus Y* = PVY) adlı etmenlerden birinin egemenliğindeki viral proteazla eksprese edilmiş bitkiler kendi virüslerine karşı yüksek derecede dayanıklılık göstermiştir. Dayanıklılık soya özgü olmuş ve muhtemelen primer poliprotein ürünlerinin normal işleyişini engellemekten(örneğin, sorun yaratan virüsün protein aktivitesinin inhibe edilmesi) kaynaklanmıştır. Sonuç olarak, viral enfeksiyon döngüsü bozulmuştur (15). Benzer bir uygulama tütün bitkisinde yardımcı bileşen proteinazın gen mühendisliği

sonucunda bir potyvürüs olan TEV'nün uzak mesafelere taşınmasını engellemek için kullanılmıştır (21).

### **RNA'ne Dayalı Dayanıklılık**

RNA aracılığıyla sağlanan dayanıklılıkta antisense RNA ve satellite RNA aracılığıyla dayanıklılık olmak üzere iki şekilde uygulanmaktadır.

Antisense RNA Aracılığıyla Dayanıklılık: Bitki virüslerinin kontrolü için incelenen diğer bir patojenden türetilmiş strateji, viral RNA'lerin antisense ve daha sonra sense segmentlerinin trasgen ifadesidir. Bu stratejinin ilkesi, bitki tarafından ifade edilen komplementer RNA dizileriyle viral RNA'nın sarılarak bağlanmasıdır. Uygunsuz RNA-RNA baz eşleşmesi imkan dahilinde replikasyon veya gen ifadesi için viral RNA'dan etkilenebilirliği önleyecektir. Böylece, antisense ve sense yapıları viral enfeksiyonun kuruluşunda önemli olan başlangıç adımlarını bloke etmek için kullanılabilir. Antisense koruma kılıf proteinine komplementer RNA eksprese edilmiş bütün bitkisinde gösterilmiştir (17). Ayrıca, CMV ve PVX adlı etmenlerde antisense dizilişlerinin kullanılması ile bazı başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Antisense RNA verilen bitkilerin kontrollere göre virüs enfeksiyonlarına daha az hassas olduğu görülmüş fakat bu korunmanın sadece düşük konsantrasyonlardaki inokulum uygulamalarında gerçekleştiği belirlenmiştir.

Genelde antisense RNA kullanılarak elde edilen dayanıklılık seviyesinin viral kapsül gen, zayıf virüs ırkı geni satellite diziliş tarafından sağlanan dayanıklılık kadar yüksek olmadığı söylenebilmektedir (18).

Satellite RNA Aracılığıyla Dayanıklılık: Satellite RNA' lar replikasyon ve virion paketlemek için yardımcı bir virüse ihtiyacı olan ve yardımcı virüsle hiç homolog dizisi bulunmamasıyla kusurlu interfere RNA'dan farklılaşan parazit RNA' larıdır. Satellite RNA' lar yardımcı virüsler tarafından neden olunan semptomları hafifletmektedir (15). Satellite RNA'lar bu özelliklerinden dolayı birçok dayanıklılık çalışmasında kullanılmıştır. Tien ve Gusui (22), hafifletici bir CMV satellite RNA ile eksprese edilen 121 transgenik domates bitkisinin CMV'nün şiddetli bir ırkıyla enjekte edildiğinde kontrol bitkilerinin veriminde %50 artış olduğunu kaydetmişlerdir. Ayrıca, Kim ve ark.(23), CMV satellite RNA ile ifade edilmiş acı biber (*Capsicum annuum*) bitkileri yetiştirmiştir. Ürün verme dönemindeki semptom azaltıcı etki CMV-Y veya CMV-Korea ırklarıyla inokule edilen bitkiler üzerinde doğrulanmıştır.

Satellitelerin kullanılmasının etkileri her zaman tahmin edilemez. Bazen satellitler kontrollere göre daha az şiddetli semptomların oluşmasına neden olabilirken bazen de daha şiddetli semptomların oluşmasına yol açabilirler. Semptomlardaki bu farklılıklar birkaç nükleotiddeki değişimlerden olabilir. Satellitlerin oluşturduğu etkiler virüs ırklarına bağlı olarak değişmektedir. Bu durum satellit dizilişlerinin kullanılmasının protein kapsül geni kullanılmasından çok daha sınırlı olduğunu göstermektedir (18).

### **Patojen Hedefli Dayanıklılık**

#### **Antiviral Proteinler**

Antiviral veya ribozom inaktive edici proteinler (RIPs) olarak adlandırılan bir sınıf polipeptit bitki türlerinde çeşitli sayılarda (en iyi bilinen kaynağı şekerçi boyası bitkisi=*Phytolacca americana*'dir) tanımlanmıştır. Uç farklı şekerçi boyası bitkisi antiviral proteini (PAP'lar) bulunmuştur. Ribozom inaktive edici işlevleri, ribozomal RNA' ni



değiştirme ve dolayısıyla polipeptit translasyonuna engel olma yeteneğinden doğmaktadır. Lodge ve ark. (24), PVX, PVY ve CMV adlı virüslere dayanıklı *Phytolacca* bitkilerinden izole edilen PAP'ini aktararak transgenik patates ve tütün bitkileri üretmiştir. Bunun sonucunda şekeriboyası antiviral proteini eksprese edilmiş transgenik tütünün, TMV' ne karşı dayanıklı olduğu bulunmuştur (25). Bu protein hücre duvarlarında konumlanmakta ve etkileşimin meydana geldiği hücre sitoplazmasında dağılmış halde bulunmaktadır. Ribozomların 60S alt birimlerinin büyük rRNA'larındaki adenini katalitik olarak uzaklaştırarak etkili olduğu bilinmektedir (26).

### **Memeli Oligoadenilat Sentaz Geni**

Memelilerde virüs enfeksiyonları ile interferon sisteminin başlatılması yoluyla savaşım yapılmaktadır. İnterferonlar virüslere karşı hayvanların savunma sisteminde bulunan proteinleri indüklemektedir. Bu olaydan bitkilerde viral enfeksiyonlara karşı geniş tabanlı dayanıklılık sağlamak için yararlanılmaktadır. İnterferonlar immunolojik saldırılara ve özellikle viral enfeksiyonlara karşılık olarak hücre çoğalması boyunca hayvan hücreleri tarafından gizlenmiştir fakat kendileri antiviral aktiviteye sahip değildir. İnterferonlar virüs çoğalmasının engellenmesi için doğrudan rol oynayan ek proteinlerin sentezini teşvik etmektedir. Bu proteinlerin biri 2'-5' oligoadenilat sentaz' dır. Bu enzim RNA virüslerinin replikasyonuna aracılık yapan çift iplikli RNA (dsRNA) tarafından aktive edilir. Aktivasyondan sonra enzim, ribonükleik asidin niteliğini bozan bir enzim olan latent endoribonükleazı (RNase L) sırasıyla aktive eden 2'-5' oligoadenilat (2-5A)' a karşı ATP' yi polimerize etmektedir. Benzer bir enzim TMV enfeksiyonundan sonra bitkilerde keşfedilebilmektedir (17).

Truve ve ark. (27), memeli farelerden 2'-5' oligoadenilat sentaz'ın ekspresyonunun patates bitkisinde PVX'ne karşı dikkate alınabilecek düzeyde bir dayanıklılık sağladığını gözlemlemiştir. Akabinde tarla çalışmalarıyla sonuçlarını teyit etmişler ve ayrıca diğer RNA virüslerine karşı geniş dayanıklılık sağlayan teknikleri geliştirmişlerdir. Ayrıca, Ogawa ve ark. (28), CMV'ne karşı dayanıklılık için memeli 2'-5' oligoadenilat sentaz ile eksprese edilmiş transgenik tütün bitkisi elde etmişlerdir.

### **Ribozim Kaynaklı Dayanıklılık**

Ribozimler esas olarak özel bölgelerde RNA moleküllerine katalitik bağlanma yeteneğinde olan RNA tabanlı RNA sınırlayıcı enzimleridir. Tarımsal açıdan önemli bitki virüsünün çoğunu RNA genomuna sahip virüsler oluşturduğundan, ribozimlerin doğrudan bağlanma yeteneği, imkan dahilinde bitki virüs hastalıklarını kontrol için kullanışlı bir strateji sağlamaktadır. Bu nedenle viral RNA' ların bağlanması için düzenlenmiş ribozimlerin transgen ifadesi viral replikasyonu ve hastalık gelişmesini engelleyebilmiştir. Farklı diziler ve yapılarıdaki ribozimlerin birçok farklı tipi tanımlanmıştır. Edington ve Nelson (29), bir protoplast sisteminde *in vivo*'daki virüs enfeksiyonuna karşı dayanıklılığı sağlamak için bir ribozimin etkinliğini test etmiştir. Sonuçlar, TMV'nün replikaz ORF' una karşı yönelen bir ribozimin enfeksiyon sonrası ilk 24 saatte yaklaşık %90 protoplasttaki viral birikmeyi azaltıcı etki yaptığını göstermiştir. Birçok çalışma, bir ribozimin bitki hücrelerinde bir model genin ifadesini önlemek için kullanılabileceğini göstermiştir. Tütün bitkisindeki daha sonraki çalışmalar, bunun transgenik bitkilerde mümkün olduğunu göstermektedir. Ribozimin hedef RNA'ni bağlama yeteneği turuncuğil cüceleşme viroidi (*citrus exocortis viroid* = CEVd)'ne karşı transgenik domates geliştirmek için kullanılmıştır. Viroidlerin kontrolü ayrıca patates iğ yumru viroidi (*potato spindle tuber viroid* = PSTV)'ne karşı

dayanıklılık elde etmek için transgenik patateslerde mayadan elde edilen bir çift iplikli RNA özel ribonükleaz eksprese edilerek başarılmıştır (17).

### **Konukçudan Türetilen Dayanıklılık**

Konukçudan türetilen dayanıklılık stratejilerinde bitkilerde virüslere karşı bulunan dayanıklılık faktörleriyle geliştirilmiştir.

#### **Viral RNA Replikasyonunun İnhibisyonu (Engellenmesi)**

Viral RNA replikasyonunun inhibisyonu, patojen hedefli dayanıklılık kısmında anlatıldığı gibi işlevsiz hale getirilmiş virüs replikazıyla gerçekleştirilebileceği gibi bitkilerde virüse replikasyonu inhibe ederek dayanıklılık sağlayan konukçu genleriyle de sağlanabilmektedir. Örneğin, Tm1 domatestede TMV replikasyonuna karşı dayanıklılık sağlayan dominant bir gendir. Viral RNA ve kodlanmış virüs bileşenlerinin sentezi, viral replikaz 126 ve 183 bileşenlerini bağlayabilen Tm1 tarafından bu bileşenleri inaktive etmek suretiyle tamamen bloke edilebilmektedir. Dayanıklılık geni, RNA replikazın temel bir bileşeni olan bir konukçu proteinini kodlayan genin bir allelidir. Dayanıklılık geninin ürünü bu konukçu proteininin bir mutanı olacaktır. Bu mutant p126 ve p183' e bağlanabilmekte fakat işlevsiz bir replikaz üretmektedir (15).

#### **Virüsün Hücreden Hücreye Hareketini Sınırlayarak Dayanıklılık**

Domatesteki dayanıklılık faktörleri Tm2 ve Tm2<sup>2</sup>, TMV'nün hareketinde etkili bir sınırlandırma göstermiştir. Bitkiler bu dayanıklılık genleriyle eksprese edilerek, TMV'nün uygun ırklarıyla saldırıya uğratıldığında nekrotik bir hipersensitif reaksiyon geliştirmektedir. Virüs taşıyıcı proteini ve Tm2 arasındaki moleküler etkileşimden kaynaklanan bu mekanizmalar kusurlu taşımayla sonuçlanarak değişebilmiş veya Tm2 faktörü, normal taşıyıcı fonksiyonla ilişkilendirilememiş ve yalnızca taşıyıcı proteinin engelleyici bir fonksiyonu gibi rol oynamıştır (15).

#### **Konukçu Hipersensitif Reaksiyonuyla Sonuçlanan Dayanıklılık**

Tütünde N hipersensitif dayanıklılık geninin varlığı TMV kılıf proteiniyle yapılan değişikliklerle haritalanmıştır. Ayrıca PVX'nün kılıf proteininin patatestede Rx ve Nx hipersensitif dayanıklılık genlerinin indüksiyonundan sorumlu olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, bitki dayanıklılık stratejilerinin, virüs bileşenleri ve konukçu arasındaki tam etkileşimlerin yokluk ya da varlığıyla bağlantılı olduğunu göstermektedir (15). Yapısal olarak diğer R gen ürünlerine benzeyen Rx gen ürünü, virüsü HR bağımlı yöntemle sınırlar. Bununla birlikte gen ürünü hücre öldürme yeteneğine sahiptir. Direnç sağlayan çok sayıda R genlerinin varlığına rağmen, N ve Rx genleri dışında sadece Tm-22 diğer bir klonlanan virüs direnç genidir (31).

#### **Bitki Antikorlarıyla Dayanıklılık**

Bitkilerde antikorların oluşması virüslere ve diğer patojenlere karşı dayanıklılık geliştirmek için alternatif bir uygulamadır. *Artichoke crinkle mottle virus* (ACMV)'ne karşı yöneltmiş bir antikor zinciriyle eksprese edilmiş transgenik tütün bitkisi bu virüse karşı oldukça yüksek dayanıklılığa sahip olmuştur. Protoplastlarla yapılan deneyler dayanıklılığın virüs partiküllerine karşı antikor zincirinin özel olarak bağlanmasıyla sonuçlandığını saptamıştır. Yapılan bir araştırmada (32), esnek bir peptid bağıyla birlikte bağlanmış bir antikorun değişken ağır ve hafif zincir

bölgelerinden meydana gelmiş sentetik bir tek zincir molekülü kullanılmış ve transgenik tütündeki fitokromlara karşı yöneltilmişlerdir. Transgenik bitkilerdeki eksprese edilmiş virüse özel antikolar virüs yaşam döngüsünü engellemek suretiyle anahtar viral proteinlerin işlevleriyle müdahale için potansiyel olarak kullanılmıştır. Örneğin, çoğalma proteinlerine özel olarak bağlı olan antikolar bu proteinleri inaktive edebilmekte, viral replikasyonu engelleyebilmekte, virion demontajı (protein kılıf ile birleşememe) veya dayanıklılık sağlamada kullanılan virüs taşıyıcı proteinlerinin bağlanmasını durdurabilmektedir (15). Bu konuda yapılan bir çalışma, viral polimeri tanıyan veya diğer tüm katalitik viral protein işlevi gören monoklonal antikoların, yapısal proteinlere bağlanan monoklonal antikolardan daha ümit verici nitelikte olduğunu ortaya koymuştur (33).

## Sonuç

Virüsler, kimyasal mücadelesi mümkün olmayan ve bitkilerde oldukça önemli zararlara neden olan patojenlerdir. Bu nedenle, virüs hastalıklarıyla mücadele zordur ve zaman gerektiren bir uğraştır. En etkili mücadele yöntemi ise kültürel önlemler (temiz üretim materyali, aşı ve budama aletlerinin dezenfeksiyonu vb.), çapraz koruma ve dayanıklı çeşit kullanmaktır.

Dayanıklı çeşitlerin kullanımı, virüs hastalıklarıyla mücadelede oldukça önemli bir konudur. Dayanıklı çeşitler, günümüzde birçok virüs hastalığına karşı kullanılmakta ve başarı sağlamaktadır. Mevcut dayanıklı çeşitlerin kullanımının yanında ıslah ve gen transferi yoluyla elde edilen dayanıklı çeşitlerin kullanımı günümüzde yaygınlaşmıştır. Bilim adamları genetik mühendisliği tekniklerine kadar gelişen dayanıklı çeşit elde etme çabalarına ilk olarak bitkilerde virüslere karşı bulunan dayanıklılık mekanizmalarını anlamak ve incelemek suretiyle başlamışlardır. Bu bağlamda virüslere karşı bitkilerde hangi mekanizmaların etkili olduğunu ve moleküler olarak dayanıklılığın nasıl gerçekleştiğini anlamak oldukça anlamlıdır. Dayanıklılık stratejilerini anlayıp kavradıktan sonra ise ıslah yoluyla dayanıklı bitkiler elde edilmeye başlanmıştır. Ancak ıslah yöntemleri zaman alıcı olduğu için artık gen transferi metotları üzerinde çalışılmaktadır.

Virüslere dayanıklı transgenik bitki elde etme stratejileri, kısa sürede gerçekleştirilmesi, istenmeyen genlerin aktarılma probleminin bulunmaması ve farklı türlerden bitkilere gen aktarılması gibi yararların yanı sıra birçok endişe ve tehdi de beraberinde getirmektedir. Bu risklerin başında potansiyel toksisite, diğer bitkilere hedefsiz gen aktarımı, muhtemel yeni virüs ve toksin oluşumu, genetik zenginliğin tehdidi ve kanser riski gelmektedir. Kısacası transgenik bitkiler avantaj ve dezavantajları birlikte barındırmaktadır. Bunların dışında virüslere dayanıklı itki elde etme konusunda Türkiye’de önemli engeller bulunmaktadır. Bu engellerin büyük bir kısmı transgen teknolojilerinin uygulanmasında yaşanmaktadır. Türkiye’nin bu konuda eksik olduğu ve sorun yaşadığı durumlar insan kaynakları, araştırmaların teşviki ve alet-ekipman imkanları başlıkları altında toplanabilmektedir. Ülkemizde transgen teknolojilerinin yakından ilgili olduğu moleküler biyoloji ve biyoteknoloji araştırmalarını yürütebilecek düzeyde yetişmiş insan oldukça azdır. Moleküler biyoloji ve modern biyoteknoloji araştırmaları açısından çok önemli olan laboratuvar altyapısı bakımından da ülkenin ülkenin durumu iç açıcı değildir. Bu alanda araştırma yapmak isteyenler için gerekli laboratuvar sayısı parmakla sayılacak kadar azdır. Buna

karşılık PCR tekniği uygulayan laboratuvar sayısı artmaktadır, ancak sadece PCR alınmasıyla yeterli bir laboratuvar düzeyine ulaşılabileceğini zanneden anlayıştan araştırma laboratuvarı olma düzeyine ulaşmak oldukça zordur. Laboratuvar altyapısı kadar önemli bir başka konu da gerekli olan malzeme bütçelerinin ülkemizde çok düşük ve gerçekçi olmamasıdır. Bu durumun en önemli nedeni araştırma fonlarından temel araştırmaya ayrılan bütçelerin çok düşük düzeyde kalmasıdır. Araştırmalarda diğer önemli bir sorun da ülkemizde araştırma geleneğinin henüz yerleşmemesidir. Belirli konularda yoğunlaşarak, uluslar arası bilim dünyasında yer alacak araştırma merkezleri henüz uygulamaya konmamıştır. Belirli merkezlerde olan altyapı insan gücü birikimi, birbirinden uzak araştırma alanlarında kullanıldığından ve araştırmacılar sık sık konu değiştirdiğinden gerekli kitle oluşmamaktadır.

Tüm eksikliklere rağmen, virüslere dayanıklı bitki elde etme çabaları devam etmekte ve başarılı sonuçlar alınmaktadır. Bu konuda ilerleme kaydedebilmek için ise eksiklerin tamamlanması konusunda gerekli önlemler acilen alınmalı ve sorunlar çözülmelidir. Unutulmamalıdır ki, virüslerle mücadelede en önemli yöntemlerden biri dayanıklı çeşit kullanmaktır.

## Kaynaklar

1. Yardımcı, N., 2001, Bitki Virüs Hastalıklarının Önemi. *Genel Bitki Virolojisi Ders Notu*, Isparta, Türkiye, 32 s.
2. Valkonen, J. P. T., 2002. Natural Resistance to Viruses, *Plant Viruses as Molecular Pathogens*, Oxford, p. 367-368.
3. Agrios, G. N., 2005. Histological Defence Structure. *Plant Pathology*, California USA, Academic Pres, p. 215.
4. Chandniwala, K. M., 2005. Histological Defence Structure. *Recent Advance in Plant Pathology*, New Delhi, India, p. 133.
5. Ueki, S. and Citovsky, V., 2002. The Systemic Movement of a Tobamoviruses Inhibited by a Cadmium-Ion-Induced Glysin-Rich Protein (cdi- GRP), *Nature Cell Biology*, 4: 478
6. Salazar, L. F., 1996, Resistance to Infection, *Potato Virus and Their Control*, 188 p.
7. İlbağı, H. ve Çıtır, A., 2006, Bitkilerde Virüs Hastalıklarına Karşı Dayanıklılık Mekanizmaları, *Bahçe*, 35 (1-3): 109-116.
8. Jeske, H., 2002, Transgenic Plants with Increased Resistance and Tolerance Against Viral Pathogens, *Plant Biotechnology and Transgenic Plants*, Stuttgart, Germany, p 523
9. Andrew, J.M., Caronta, C. and Boulton, M.I., 2007, Sources of Natural Resistance to Plant Viruses: Status and Prospects. *Molecular Plant Pathology* 8 (2), 223-231
10. Soosaar, J. L. M., Smith, T. M. B. and Kumar, S. P. D., 2005, Mechanisms of Plant Resistance to Viruses, *Nature Reviews Microbiology*, 3: 789-798
11. Diaz- Pendom, J. A., Truniger, V., Nieto, C., Garcia- Mas, J., Bendahmane, A. and Aranda, M. A., 2004, Advances in understanding recessive resistance to Plant Viruses, *Molecular Plant Pathology* 5: 223- 233.

12. Kang, B. C., Yeam, I. and Jahn, M., 2005, Genetic of Plant Virus Resistance, *Ann. Rev. Phytopathology* 43: 581- 621
13. Değirmenci, K. ve Ertunç, F., 2010, Virüs Enfeksiyonlarıyla Mücadelede Gen Susturulması ve Uygulamaları, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR.*, 08 (2), 35-52
14. Sanford, J.C. and Johnston, S.A., 1985, The Concept of Pathogens Derived Resistance: Deriving Resistance Genes from the Parasite's Own Genome, *J. Theor. Biol.* 113: 395-405
15. Anandan, R., 2003, Transgenic Resistance to Plant Viruses. [http://www.protocolonline.org/files/protocol\\_3485.pdf](http://www.protocolonline.org/files/protocol_3485.pdf) (Erişim tarihi: 20. 09. 2010)
16. Powell-Abel, P., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T. and Beachy, R.N., 1986, Delay of Disease Development in Transgenic Plants That Express the *Tobacco mosaic virus* Coat Protein, *Science* 232: 738-743
17. Chawla, H. S., 2002, *Introduction to Plant Biotechnology Second Edition*, USA, p.399-403.
18. Açıkgöz, S., 1994, Bitki Virüs Dayanıklılığı ve Genetik Mühendisliği, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 25 (2), 262-268,
19. Golemboski, D.B., Lomonossoff, G.P., and Zaitlin, M., 1990, Plants Transformed with a Tobacco Mosaic Nonstructural Gene Sequence are Resistant to the Virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87,6311-6315.
20. Fitch, J.H. and Beachy, R.N. 1993. Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. *Annu. Rev. Microbiol.*, 47: 739-763.
21. Cronin, S., Verchot, J., Haldeman - Cahill, R., Schaad, M. C. and Carrington, J. C., 1995, Long-distance Movement Factor: A Transport Function of the Potyvirus Helper Component Proteinase. *Plant Cell* 7: 549-559.
22. Tien, P. and Gussui, N., 1991, Satellite RNA for the Biocontrol of Plant Diseases, *Adv. Virus Resistance*, 39: 321
23. Kim, S. J., Lee, D. J., Kim, B. D. and Paek, K. H., 1997, Satellite- RNA-mediated Resistance to *Cucumber Mosaic Virus* in Transgenic Plants of Hot pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Golden Tower). *Plant Cell Rep.* 16:825–830
24. Lodge, J.K., Kaniewski, W.K. and Tumer, N.E., 1993, Broad-spectrum Virus Resistance in Transgenic Plants Expressing Pokeweed Antiviral Protein. *Proc Nat. Acad Sci*, 90: 7089-7093
25. Wang, P., Zoubenko, O. and Tumer, N. E., 1998, Reduced Toxicity and Broad Spectrum Resistance to Viral and Fungal Infection in Transgenic Plants Expressing Pokeweed Antiviral Protein II, *Plant Molecular Biology*, Dec; 38 (6): 957- 964
26. Nayudu, M. V., 2008, Protein Inhibitors, *Plant Viruses*, Nagar, New Delhi, p. 540.
27. Truve, E., Aaspollu, A., Houkanen, J., Puska, R., Mehto, M., Hassl, A., Teeri, T.H., Kelve, M., Seppänen, P. and Saarma, M., 1993, Transgenic potato plants expressing 2'-5' oligoadenylate synthetase are protected from potato virus X infection under field conditions, *Bio/Technology* 11: 1048-1052.
28. Ogawa, T., Hori, T. and Ishida I., 1996, Virus - induced cell death in plants expressing the mammalian 2',5' oligoadenylate system. *Nature Biotechnology* 14: 1566-1569.

29. Edington, B.V. and Nelson, R.S., 1992, Utilization of Ribozymes in Plants. Plant Viral Resistance. In: *Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA* (RP Erickson, JG Izant eds), Raven Press, New York, 209-221
30. Akbulut, M. ve Gülşen, O., 2010. Genetik Mühendisliği Yöntemleri Kullanılarak Virüse Dirençli Bitkilerin Elde Edilmesi. *Erciyes Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 26 (4), 328-339
31. Owen, M., Gandecha, A., Cockburn, B. and Whitelam, G., 1992, Synthesis of a Functional Anti-phytochrome Sing-chain FV Protein in Transgenic Tobacco, *Bio/Technology* 10: 790.
32. Goldbach, R., Bucher, E. and Prins, M., 2003, Resistance Mechanisms to Plant Viruses: An Overview, *Virus Research* 92, 207-212