



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Plum pox virus (PPV) T İRKİNİN BAZI BİYOLOJİK
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ ve MELEZ KAYISI
BİTKİLERİNDE PPV'YE DAYANIKLILIĞIN MOLEKÜLER
MARKÖRLERİLE ARASTIRILMASI

Songül YALÇIN

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

HATAY
KASIM-2014



T.C.

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Plum pox virus* (PPV) T İRKİNİN BAZI BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ ve MELEZ KAYISI BİTKİLERİNDE PPV'YE
DAYANIKLILIĞIN MOLEKÜLER MARKÖRLERLE ARAŞTIRILMASI**

Songül YALÇIN

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**HATAY
KASIM-2014**

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Plum pox virus (PPV) T IRKİNİN BAZI BİYOLOJİK
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ ve MELEZ KAYISI
BİTKİLERİNDE PPV'YE DAYANIKLILIĞIN MOLEKÜLER
MARKÖRLERLE ARAŞTIRILMASI*

SONGÜL YALÇIN
DOKTORA TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Doç. Dr. Mona GAZEL danışmanlığında hazırlanan bu tez 20/11/2014 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.



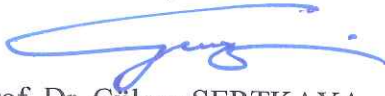
Doç. Dr. Mona GAZEL
Başkan



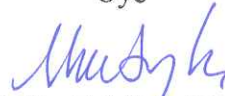
Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN
Üye



Prof. Dr. Çiğdem ULUBAŞ SERÇE
Üye



Prof. Dr. Gülşen SERTKAYA
Üye



Prof. Dr. E. Mine SOYLU
Üye

Kod No: 56

Prof. Dr. İsmail Hakkı KARAHAN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 348

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

20.11.2014

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.



SONGÜL YALÇIN

ÖZET

***Plum pox virus* (PPV) T İRKİNİN BAZI BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ ve MELEZ KAYISI BİTKİLERİNDE PPV'YE DAYANIKLILIĞIN MOLEKÜLER MARKÖRLERLE ARAŞTIRILMASI**

Plum pox virus (PPV), sert çekirdekli meyve ağaçlarına zarar veren en önemli virüs etmenidir. Bu virüsün ırkları arasında yer alan PPV-T, Türkiye'ye özgü bir ırktır. Bu çalışmada, PPV-T'nin vektörlerle deneysel taşınma durumunu araştırmak amacıyla, *Aphis gossypii*, *Hyalopterus pruni* ve *Myzus persicae* ile otsu konukçulardan *Pisum sativum* 'Colmo' ve 'Siena', *Cucumis sativus*, *Nicotiana benthamiana*'ya ve odunsu konukçulardan ise Myrobalan 29C (*Prunus cerasifera*)'ye taşıma çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca, Malatya İnönü Üniversitesi Kayısı Araştırma Parseli'nde PPV'ye dayanıklılık kazandırılmak üzere açık arazide Stark Early Orange (SEO) ile yerli kayısı çeşitlerinin (Hacıhaliloğlu, Adilcevaz 5, Çöloğlu, Şekerpare, Çataloğlu) melezlenmesi sonucu elde edilen 134 adet melezin PPV dayanıklılık allellerini taşıyıp taşımadığı araştırılmıştır.

PPV-T'nin 'kontrollü beslenme yöntemi' (KBY) kullanılarak yürütülen deneysel taşıma denemelerinde 60 adet *P. sativum* 'Colmo' bezelye ve 57 adet *N. benthamiana* tütün kullanılmış, yapılan DAS-ELISA ve real-time RT-PCR analizlerinde *M. persicae*'nin PPV'yi bezelye ve tütün bitkilerine sırasıyla % 21.60 ve % 25.40 oranında taşıdığı tespit edilmiştir.

A. gossypii ile KBY'ye göre yürütülen PPV-T taşıma denemesinde toplam 20 adet tütün, 50 adet bezelye ('Colmo' ve 'Siena') ve 20 adet hıyar bitkisi kullanılmış ve *A. gossypii*'nin PPV'yi tütüne %15 oranında taşıdığı, ancak bezelye ve hıyar bitkilerine taşımadığı saptanmıştır.

H. pruni ile KBY'ye göre yürütülen PPV-T deneysel taşıma denemesinde, 6 adet Myrobalan 29C bitkisi kullanılmıştır. Denemede, 2 yıl süresince yapılan tüm DAS-ELISA ve real-time RT-PCR analizlerinde Myrobalan 29C bitkilerinin tamamı PPV bakımından negatif bulunmuştur.

PPV-T'nin 'serbest beslenme yöntemi' (SBY) kullanılarak *M. persicae* ve *A. gossypii* yaprak bitleri ile *N. benthamiana*'ya yapılan taşıma denemelerinde, *M. persicae* yaprak bitinin PPV'yi % 16.79 oranında taşıdığı tespit edilmiştir.

Melez kayısı bitkilerinin PPV'ye dayanıklılık durumunu belirlemek amacıyla yürütülen moleküler markörlerle tarama çalışmasında, SEO ile yerli kayısı çeşitlerinin melezlenmesi sonucu elde edilen 134 adet melezin 47 tanesinin PPV'ye dayanıklılık allelini taşıdığı saptanmıştır.

Bu çalışma, PPV-T'nin yaprak bitleri ile deneysel taşınma etkinliğinin araştırılması konusunda ülkemizde yapılan ilk çalışma olup dayanıklılık çalışmaları sonucu elde edilen melezlerin moleküler markörler kullanılarak PPV'ye dayanıklılık alleli taşıyıp taşımadığının hızlı bir şekilde belirlenebileceğini ortaya koymuştur.

2014, 111 Sayfa

Anahtar Kelimeler: PPV-T, SEO, dayanıklılık, yaprak biti, deneysel taşıma

ABSTRACT

DETERMINATION OF SOME BIOLOGICAL PROPERTIES OF *Plum pox virus* (PPV) T STRAIN AND INVESTIGATION ON RESISTANCE OF APRICOT CROSSING PROGENIES AGAINST PPV THROUGH MOLECULAR MARKERS

Plum pox virus (PPV) is the most important virus which is damaging stone fruit trees. Among the other strains, PPV-T is a unique strain for Turkey. In this study, PPV-T was experimentally transmitted to herbaceous hosts of *Pisum sativum* ‘Colmo’ and ‘Siena’, *Cucumis sativus*, *Nicotiana benthamiana* and woody host, Myrobalan 29C (*Prunus cerasifera*) by using *Aphis gossypii*, *Hyalopterus pruni* and *Myzus persicae*. It was also investigated if 134 progenies, obtained by crossing Stark Early Orange (SEO) and local apricot varieties (Hacihaliloglu, Adilcevaz 5, Çöloglu, Sekerpare, Çataloglu) in order to provide PPV resistance in open field of Apricot Investigation Center belong to Malatya İnönü University, have resistance alleles.

Experimental transmission trials of PPV-T by using ‘controlled acquisition access period’ (CAAP) method showed that when PPV was transmitted to 57 tobacco and 60 pea (*P. sativum* ‘Colmo’) by using *M. persicae* and tested by DAS-ELISA and real-time RT-PCR analysis, infection rates were found as 21.60 % and 25.40 %, respectively.

In the experimental trials by using CAAP method, when PPV-T inoculated *A. gossypii* were fed on 20 cucumber, 50 pea (‘Colmo’ and ‘Siena’) and 50 tobacco plants, PPV wasn’t transmitted to cucumber and pea, but it was transmitted to tobacco plants at the rate of 15 %.

PPV-T was experimentally transmitted by *H. pruni* to 6 Myrobalan 29C plants according to CAAP method. All plants gave negative results for PPV in DAS-ELISA and real-time RT-PCR assays for 2 years.

It was found that PPV-T was transmitted to tobacco plants at the rate of 16.79 % by using *M. persicae* in the experimental transmission trials with ‘unrestricted probing method’ (UPM).

In the PPV resistance studies, screening of apricot progenies by using molecular markers, out of 134 progenies, which was obtained by crossing SEO and local varieties, 47 was found including resistant alleles for PPV.

This study is the first report on experimental transmission efficiency of PPV-T using by different aphid species. It was also demonstrated that progenies, which were obtained from resistance studies, could be quickly determined by using molecular markers whether they have resistant alleles to PPV.

2014, 111 Pages

Key Words: PPV, SEO, resistance, aphids, experimental transmission

TEŞEKKÜR

Doktora tez konusunun belirlenmesinde, araştırılması ve yazımı sırasında sahip olduğu bilgi birikimi ve tecrübesi ile çalışmayı yönlendiren ve her türlü yardımı esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Mona GAZEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Akademik kariyere başlamama vesile olan ve bu süreçte değerli fikir ve görüşleri ile çalışmalarına katkı sağlayan sayın Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN'a, akademik hayatımdaki ilk danışmanım olan ve bu yolda hep yanımda olduğunu hissettiğim, araştırmalarımda yardım ve desteğini esirgemeyen, bilgilerimin şekillenip olgunlaşmasını sağlayan değerli hocam sayın Prof. Dr. Çiğdem ULUBAŞ SERÇE'ye, değerli bilgileri ve güzel yüreğiyle yolumu aydınlatan saygıdeğer hocam sayın Prof. Dr. Gülşen SERTKAYA'ya, çalışmalarım süresince sundukları tüm destek ve olanaklar için İzmir Zirai Karantina Müdürlüğü'ne ve ayrıca müdürlerimden sayın Süleyman İLHAN ve sayın Ender M. GÜMÜŞ'e, çalışmalarına maddi destek veren MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna (Proje No: 348), çalışmalarına fikirleriyle katkı sağlayan sayın Prof. Dr. Mukaddes KAYIM'a, çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Kamuran KAYA'ya ve Doç. Dr. Serdar SATAR'a, ayrıca hep desteklerini hissettiğim TOROS TARIM Agripark Biyoteknoloji Merkezi çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında ve hayatımın her alanında bana büyük bir özveri ve sabırla destek olan, varlıklarıyla hayatımı anlamlandıran aileme ve eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	XIII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	9
2.1. Türkiye’de PPV’nin Varlığı, PPV’nin Biyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi ve PPV’ye Dayanıklılık ile İlgili Yapılan Çalışmalar	10
2.2. Dünya’da PPV’nin Varlığı, PPV’nin Biyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi ve PPV’ye Dayanıklılık ile İlgili Yapılan Çalışmalar	16
3. MATERYAL ve YÖNTEM	24
3.1. Materyal	24
3.1.1. ‘ <i>Plum pox virus</i> (PPV) T Irkının Bazı Biyolojik Özelliklerinin Araştırılması’ Çalışmalarında Kullanılan Bitki ve Yaprak Biti Materyalleri	24
3.1.2. ‘Melez Kayısı Bitkilerinde PPV’ye Dayanıklılığın Moleküler Markörlerle Araştırılması’ Çalışmalarında Kullanılan Bitki Materyalleri	24
3.2. Yöntem	26
3.2.1. ‘ <i>Plum pox virus</i> (PPV) T Irkının Bazı Biyolojik Özelliklerinin Araştırılması’ Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler	26
3.2.1.1. Test Bitkilerinin Yetiştirilmesi ve Temini	26
3.2.1.2. İnokulum Kaynağı Bitkilerin Elde Edilmesi	26
3.2.1.3. Yaprak Bitlerinin Temini ve Çoğaltılması	27
3.2.1.4. PPV-T’nin Yaprak Bitleri ile Deneysel Taşıma Denemeleri	29
3.2.1.4.1. ‘Kontrollü Beslenme Yöntemi’ (KBY) ile Deneysel Taşıma Denemeleri	29

3.2.1.4.1.1. <i>Myzus persicae</i> ile Bezelye (<i>Pisum sativum</i> ‘Colmo’; <i>Pisum sativum</i> ‘Siena’) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemeleri	29
3.2.1.4.1.2. <i>Myzus persicae</i> ile Tütün (<i>Nicotiana benthamiana</i>) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemeleri	32
3.2.1.4.1.3. <i>Aphis gossypii</i> ile Bezelye (<i>Pisum sativum</i> ‘Colmo’; <i>Pisum sativum</i> ‘Siena’) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemeleri	39
3.2.1.4.1.4. <i>Aphis gossypii</i> ile Tütün (<i>Nicotiana Benthamiana</i>) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemeleri.....	41
3.2.1.4.1.5. <i>Aphis gossypii</i> ile Hıyar (<i>Cucumis sativus</i>) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemeleri.....	43
3.2.1.4.1.6. <i>Hyalopteru pruni</i> ile Myrobalan 29C (<i>Prunus cerasifera</i>) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemeleri	44
3.2.1.4.2. ‘Serbest Beslenme Yöntemi’ (SBY) ile Deneysel Taşıma Denemeleri.....	47
3.2.1.4.2.1. <i>Myzus persicae</i> ile Tütün (<i>Nicotiana benthamiana</i>) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemeleri	47
3.2.1.4.2.2. <i>Aphis gossypii</i> ile Tütün (<i>Nicotiana Benthamiana</i>) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemeleri.....	51
3.2.1.5. DAS- ELISA Analizleri	51
3.2.1.6. Nükleik Asit (RNA) İzolasyonu	53
3.2.1.7. Real-time RT-PCR Analizleri	54
3.2.1.7.1. RNA İzolasyonu Sonrası Real-time RT-PCR Analizi	55
3.2.1.7.2. Örneklerin Spot Real-time RT-PCR İçin Hazırlanması ve Spot Real-time RT-PCR Analizi	56
3.2.2. ‘Melez Kayısı Bitkilerinde PPV’ye Dayanıklılığın Moleküler Markörlerle Araştırılması’ Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler	59
3.2.2.1. Melez Bitkilerin Temini ve Muhafazası.....	59
3.2.2.2. Melez Bitkilerden DNA İzolasyonu.....	59

3.2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR) Analizleri.....	61
3.2.2.4. PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi: Agaroz Jel Elektroforezi.....	62
3.2.2.5. PCR Ürünlerinin Kapiller Elektroforezi	62
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	64
4.1. <i>Plum pox virus</i> (PPV) T Irkının Bazı Biyolojik Özelliklerinin Araştırılması' Çalışmalarının Bulguları	64
4.1.1. Mekanik Yolla PPV-T Enfeksiyonu Yapılan Bitkilerin Simptomatolojik Gözlemleri, DAS-ELISA ve Real-time RT-PCR Analizleri.....	64
4.1.2. PPV-T 'nin Yaprak Bitleri ile Deneysel Taşıma Denemeleri.....	66
4.1.2.1. 'Kontrollü Beslenme Yöntemi' (KBY) ile Deneysel Taşıma Denemeleri	67
4.1.2.1.1. <i>Myzus persicae</i> ile Bezelye (<i>Pisum sativum</i> 'Colmo'; <i>Pisum sativum</i> 'Siena') Bitkisine Deneysel Taşıma Denemelerinin DAS-ELISA ve Real-time RT-PCR Analizleri.....	67
4.1.2.1.2. <i>Myzus persicae</i> ile Tütün (<i>Nicotiana benthamiana</i>) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemelerinin DAS-ELISA ve Real-time RT-PCR Analizleri.....	69
4.1.2.1.3. <i>Aphis gossypii</i> ile Bezelye (<i>Pisum sativum</i> 'Colmo'; <i>Pisum sativum</i> 'Siena') Bitkisine Deneysel Taşıma Denemelerinin DAS-ELISA ve Real-time RT-PCR Analizleri.....	74
4.1.2.1.4. <i>Aphis gossypii</i> ile Tütün (<i>Nicotiana benthamiana</i>) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemelerinin DAS-ELISA ve Real-time RT-PCR Analizleri.....	74
4.1.2.1.5. <i>Aphis gossypii</i> ile Hıyar (<i>Cucumis sativus</i>) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemesinin DAS-ELISA ve Real-time RT-PCR Analizleri.....	79
4.1.2.1.6. <i>Hyalopterus pruni</i> ile Myrobalan 29C (<i>Prunus cerasifera</i>) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemelerinin DAS-ELISA ve Real-time RT-PCR Analizleri	81
4.1.2.2. 'Serbest Beslenme Yöntemi' (SBY) ile Deneysel Taşıma Denemeleri	83

4.1.2.2.1. <i>Myzus persicae</i> ile Tütün (<i>Nicotiana benthamiana</i>) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemelerinin DAS- ELISA ve Real-time RT-PCR Analizleri.....	83
4.1.2.2.2. <i>Aphis gossypii</i> ile Tütün (<i>Nicotiana benthamiana</i>) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemelerinin DAS- ELISA ve Real-time RT-PCR Analizleri.....	89
4.2. Melez Kayısı Bitkilerinde PPV'ye Dayanıklılığın Moleküler Markörlerle Araştırılması'	90
4.2.1. Melez Bitkilerden DNA İzolasyonları	90
4.2.2. Melez Bitkilerin PCR ve Kapillar Elektroforez Analizleri DNA İzolasyonları	90
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	94
KAYNAKLAR	99
ÖZGEÇMİŞ	108
EKLER	109
Ek 1. DAS-ELISA Analizinde Kullanılan Tampon Çözeltilerin İçerikler	109
Ek 1. High Pure Viral Nucleic Acid Kit Kimyasallarının Analize Hazırlanması	111

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3. 1. Patlıcan bitkisi üzerinde saf kültür olarak çoğaltılan <i>Myzus persicae</i> yaprak bitleri	28
Şekil 3. 2. Patlıcan bitkisi üzerinde (solda) ve hıyar bitkisi üzerinde (sağda) saf kültür olarak çoğaltılan <i>Aphis gossypii</i> yaprak bitleri	28
Şekil 3. 3. <i>Myzus persicae</i> ile taşıma denemelerinde kullanılan <i>Pisum sativum</i> ‘Colmo’ (solda) ve <i>P. sativum</i> ‘Siena’ bitkileri (sağda).....	30
Şekil 3. 4. Bezelye bitkilerinin üzerine tabanı kesilmiş falkon tüp geçirilerek <i>Myzus persicae</i> ile PPV-T deneysel taşıma denemelerine hazırlanması	30
Şekil 3. 5. <i>Myzus persicae</i> yaprak bitlerinin, çoğaltıldığı patlıcan bitkisi üzerinden emgi tüpü yardımı ile toplanması (solda) ve petri içerisine konulması (sağda).....	31
Şekil 3. 6. <i>Myzus persicae</i> yaprak bitlerinin PPV-T Ankara izolatu ile enfekteli Myrobalan 29C yaprağı üzerinde beslenmesi	31
Şekil 3. 7. PPV-T enfekteli yapraktan emgi tüpü ile toplanan <i>Myzus persicae</i> yaprak bitlerinin indikatör bezelye bitkisi üzerine aktarılması	32
Şekil 3. 8. Sağlıklı tütün (<i>Nicotiana benthamiana</i>) bitkilerine tabanı kesik falkon tüp geçirilerek deneysel taşıma denemesine hazırlanması.....	33
Şekil 3. 9. Patlıcan bitkisi üzerinden emgi tüpü yardımı ile toplanan <i>Myzus persicae</i> yaprak bitlerinin (solda) kapaklı cam tüplere alınması ve beyaz ışık üzerinde bekletilmesi (sağda).....	34
Şekil 3. 10. Beyaz ışık üzerine alınan ve canlı kalması için yaprak sapı saf su dolu ependorf tüp içine batırılmış olan PPV-T enfekteli kayısı yaprağı üzerinde, <i>Myzus persicae</i> yaprak bitlerinin beslenmesinin sağlanması	35
Şekil 3. 11. <i>Myzus persicae</i> yaprak bitlerinin PPV-T enfekteli kayısı yaprağı üzerinden emgi tüpü ile toplanması	36
Şekil 3. 12. <i>Myzus persicae</i> ’nin enfekteli kayısı yaprağında beslendikten sonra sağlıklı tütün bitkisi üzerine aktarılması (1), <i>Myzus persicae</i> yaprak bitlerinin sağlıklı tütün bitkisi üzerinde beslenmesi (2), yaprak bitlerinin tütün bitkisine aktarıldıktan sonra falkon tüpün kapağının kapatılması (3)	36
Şekil 3. 13. PPV-T enfekteli Myrobalan 29C yaprağı üzerinde <i>Myzus persicae</i> yaprak bitlerinin beslenmesi.....	37
Şekil 3. 14. PPV-T enfekteli tütün yaprağı üzerinde <i>Myzus persicae</i> yaprak bitlerinin beslenmesi	38
Şekil 3. 15. Sağlıklı tütün bitkisinde beslenen <i>Myzus persicae</i> yaprak bitleri	39
Şekil 3. 16. Çoğaltıldığı hıyar bitkisi yaprağı üzerinden emgi tüpü ile toplanan <i>Aphis gossypii</i> yaprak bitlerinin (1) petri içerisinde toplanması (2)	40
Şekil 3. 17. <i>Aphis gossypii</i> yaprak bitlerinin PPV-T enfekteli Myrobalan 29C bitkisi üzerinde (solda) ve sağlıklı bezelye bitkisi üzerinde (sağda) beslenmesi	41

Şekil 3. 18. Hıyar bitkisi üzerinden emgi tüpü ile toplanan <i>Aphis gossypii</i> yaprak bitlerinin (solda) petri kabı içerisine alınması (sağda)	42
Şekil 3. 19. <i>Aphis gossypii</i> yaprak bitlerinin PPV-T enfekteli tütün bitkisi üzerinde (1) ve sağlıklı indikatör tütün bitkisi üzerinde (2) beslenmesi	42
Şekil 3. 20. Sağlıklı hıyar bitkisi üzerine aktarılmış olan <i>Aphis gossypii</i> yaprak bitleri	43
Şekil 3. 21. <i>Hyalopterus pruni</i> yaprak bitlerinin ependorf tüpün tabanı ile membran (3 MM Whatman) üzerine ezilerek (solda) pesn yardımı ile ependorf tüp içerisine alınması (sağda).....	45
Şekil 3. 22. <i>Hyalopterus pruni</i> yaprak bitlerinin erik yapraklarından emgi tüpü yardımı ile toplanarak petri kapları içerisine alınması	46
Şekil 3. 23. <i>Hyalopterus pruni</i> yaprak bitlerinin PPV-T enfekteli Myrobalan 29C bitkisi üzerinde beslenmesi.....	46
Şekil 3. 24. PPV-T enfekteli yaprak üzerinden emgi tüpü yardımı ile toplanmış olan <i>Hyalopterus pruni</i> yaprak bitlerinin sağlıklı Myrobalan 29C bitkisine aktarılması (solda) ve yaprak biti aktarılan yaprakların beyaz iplikle işaretlenmesi	47
Şekil 3. 25. Üzerinde <i>Myzus persicae</i> yaprak bitleri bulunan PPV-T enfekteli kayısı yapraklarının, sağlıklı tütün bitkileri üzerindeki görüntüsü	48
Şekil 3. 26. <i>Myzus persicae</i> yaprak bitlerinin serbest beslenmesini sağlamak amacıyla konulduğu tül kafesin (100x 50x 80 ;derinlik: en: yükseklik) görüntüsü	49
Şekil 3. 27. <i>Myzus persicae</i> yaprak bitlerinin emgi tüpü ve fırça yardımı ile PPV-T enfekteli tütün bitkisine aktarılması	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 3. 28. <i>Myzus persicae</i> yaprak bitlerinin serbest beslenmesini sağlamak amacıyla tül kafes içerisine yerleştirilen PPV-T enfekteli tütün bitkisi ve sağlıklı indikatör tütün bitkileri	51
Şekil 3. 29. Spot real-time RT-PCR analizi için küçük parçalara kesilmiş membranın (3MM Whatman)ependorf tüp içine yerleştirilmesi (solda) ve üzerine bitki ekstraktı eklenmesi (sağda)	57
Şekil 4. 1. Mekanik inokulasyonla PPV-T enfektelenen <i>Nicotiana benthamiana</i> tütün bitkisinin yapraklarındaki geniş mozaik lekeler ve renk açılmaları	65
Şekil 4. 2. PPV-T enfekteli tütünden mekanik inokulasyonla PPV-T enfektelenen <i>Nicotiana benthamiana</i> tütün bitkisinin yapraklarındaki mozaik belirtiler ve renk açılmaları.....	66
Şekil 4. 3. PPV-T'nin <i>Myzus persicae</i> ile deneysel taşıma denemesinde kullanılan 'Colmo' bezelye bitkilerinin yapraklarındaki mozaik belirtiler (1) ve bitkilerin yaprak ucunda kaşılaşmalar (2)	68
Şekil 4. 4. <i>Myzus persicae</i> ile PPV-T deneysel taşıma denemesinde kullanılan, yaprak damarlarında bantlaşma, damar aralarında renk açılmaları ve yaprak üzerinde kabartılar gözlenen 3 nolu <i>Nicotiana benthamiana</i> tütün bitkisi	70

Şekil 4. 5. <i>Myzus persicae</i> ile PPV-T deneysel taşıma denemesinde kullanılan, damar aralarında açılmalar, damarlarda koyu renklenmeler, yaprak uçlarında kıvrılmalar ve şekil bozuklukları gözlenen 7 nolu <i>Nicotiana benthamiana</i> tütün bitkisi	71
Şekil 4. 6. Viral RNA izolasyonu sonrasında real-time RT-PCR ile PPV tespit edilen 3 (MP3- T) ve 7 (MP7- T) nolu tütün bitkilerinin real-time Roche 480 II cihaz verilerine göre analiz sonuç raporu. Analiz sonucuna göre 3 nolu bitki 20.45 CP (20'nci Döngü)'de pozitif sonuç vermiş, 7 nolu örnek ise 19.20 CP (19'uncu Döngü)'de pozitif sonuç vermiştir. CP: Crossing point (DNA çoğalmasının görünebilir olduğu ilk nokta); PC: Pozitif kontrol (PPV-M); NC: Negatif kontrol (Su kontrol); MP: <i>Myzus persicae</i>	72
Şekil 4. 7. Viral RNA izolasyonu sonrasında real-time RT-PCR ile PPV pozitif tespit edilen 3 (MP3- T) ve 7 (MP7- T) nolu tütün bitkilerinin ve pozitif kontrolün real time Roche 480 II cihaz verilerine göre DNA amplifikasyon eğrisi. MP: <i>Myzus persicae</i>	73
Şekil 4. 8. <i>Aphis gossypii</i> ile PPV-T taşıma denemelerinde kullanılan ve yapraklarında sarı mozaik lekeler ve küçülmeler gözlenen 2 nolu <i>Nicotiana benthamiana</i> tütün bitkisi	75
Şekil 4. 9. <i>Aphis gossypii</i> ile PPV-T taşıma denemelerinde kullanılan ve yaprak damar aralarında sararmalar, yapraklarında sarı mozaik lekeler ve küçülmeler gözlenen 8 nolu <i>Nicotiana benthamiana</i> tütün bitkisi.....	76
Şekil 4. 10. <i>Aphis gossypii</i> ile PPV-T yaşma denemelerinde kullanılan ve yaprak damarlarında renk açılmaları (solda) ve üst yapraklarda küçülmeler (sağda) gözlenen 5 nolu <i>Nicotiana benthamiana</i> tütün bitkisi.....	76
Şekil 4. 11. <i>Aphis gossypii</i> ile PPV-T taşıma denemelerinde kullanılan ve viral RNA izolasyonu sonrasında real-time RT-PCR ile PPV tespit edilen 2 (AG 2), 5 (AG 5) ve 8 (AG 8) nolu <i>Nicotiana benthamiana</i> tütün bitkilerinin real-time Roche 480 II cihaz verilerine göre analiz sonuç raporu. Buna göre 2 nolu bitki 22.33 CP'de, 5 nolu bitki 32.70 CP'de ve 8 nolu bitki ise 21.47 CP düzeyinde PPV pozitif bulunmuştur. CP: Crossing point (DNA çoğalmasının görünebilir olduğu ilk nokta); PC: Pozitif kontrol (PPV-M); NC: Negatif kontrol (Su kontrol); AG: <i>Aphis gossypii</i>	78
Şekil 4. 12. <i>Aphis gossypii</i> ile PPV-T taşıma denemelerinde kullanılan ve viral RNA izolasyonu sonrasında real-time RT-PCR ile PPV tespit edilen 2 (AG 2), 5 (AG 5) ve 8 (AG 8) nolu <i>Nicotiana benthamiana</i> tütün bitkilerinin real time Roche 480 II cihaz verilerine göre DNA amplifikasyon eğrisi. PC 25.döngüde, 2 nolu bitki 22.döngüde, 8 nolu bitki 21.döngüde ve 5 nolu bitki 32.döngüde PPV pozitif değer göstermiştir. PC: Pozitif kontrol; AG: <i>Aphis gossypii</i>	79

Şekil 4. 13. Sağlıklı hıyar (<i>Cucumis sativus</i>) bitkisinin normal büyüklükteki yaprağı (solda) ve <i>Aphis gossypii</i> ile deneysel taşıma denemelerinde kullanılan hıyar bitkisinin yapraklarındaki küçülmeler ve gelişme geriliği (sağda)	80
Şekil 4. 14. <i>Myzus persicae</i> ile PPV-T deneysel taşıma denemelerinde kullanılan ve yaprak damarlarında bant şeklinde koyulaşmalar ve damar aralarında mozaik symptom gözlenen 6 nolu <i>Nicotiana benthamiana</i> tütün bitkisi.....	84
Şekil 4. 15. Viral RNA izolasyonu sonrasında real-time RT-PCR ile PPV tespit edilen 6 nolu (MP6- K) tütün bitkisinin real-time Roche 480 II cihaz verilerine göre analiz sonuç raporu. 6 nolu bitki 21.82 CP düzeyinde PPV pozitif bulunmuştur. CP: Crossing point (DNA çoğalmasının görünebilir olduğu ilk nokta) PC: Pozitif kontrol (PPV-M); NC: Negatif kontrol (Su kontrol); MP: <i>Myzus persicae</i>	85
Şekil 4. 16. Viral RNA izolasyonu sonrasında real-time RT-PCR ile PPV tespit edilen tütün bitkisinin (MP6-K) ve pozitif kontrolün real-time Roche 480 II cihaz verilerine göre DNA amplifikasyon eğrisi. Buna göre, PC 19. döngüde, 6 nolu bitki 21. döngüde PPV pozitif sonuç vermiştir. MP: <i>Myzus persicae</i> ; PC: Pozitif kontrol.....	86
Şekil 4. 17. <i>Myzus persicae</i> ile PPV-T deneysel taşıma denemelerinde kullanılan ve yapraklarında renk açılmaları ve yaprak uçlarında kıvrılmalar gözlenen 3, 4, 6 nolu <i>Nicotiana benthamiana</i> tütün bitkileri	87
Şekil 4. 18. Viral RNA izolasyonu sonrasında real-time RT-PCR ile PPV tespit edilen 6 nolu (MP6) <i>Nicotiana benthamiana</i> tütün bitkisinin real-time Roche 480 II cihaz verilerine göre analiz sonuç raporu. Buna göre, PC 24.15 CP’de, 6 nolu bitki 25.53 CP’de pozitif sonuç vermiştir. CP: Crossing point (DNA çoğalmasının görünebilir olduğu ilk nokta); PC: Pozitif kontrol (PPV-T); NC: Negatif kontrol (Su kontrol); MP: <i>Myzus persicae</i>	88
Şekil 4. 19. Viral RNA izolasyonu sonrasında real-time RT-PCR ile PPV tespit edilen tütün bitkisinin (MP6) ve pozitif kontrolün real time Roche 480 II cihaz verilerine göre DNA amplifikasyon eğrisi. Buna göre, PC 24.döngüde, 6 nolu bitki 25.döngüde PPV pozitif sonuç vermiştir. MP: <i>Myzus persicae</i> ; PC: Pozitif kontrol	89

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3. 1. SEO ile melezlenen yerli kayısıların (Hacıhaliloğlu, Adilcevaz5, Çöloğlu, Şekerpare ve Çataloğlu) ebeveyn kombinasyonları ve çalışmalarda kullanılan melez bitki sayıları	25
Çizelge 3. 2. Real time RT- PCR analizinde kullanılan primer/ prob dizilimleri.....	55
Çizelge 3. 3. Real-time RT-PCR reaksiyon karışımı (RNA Virus Master; Roche).....	56
Çizelge 3. 4. Real-time RT-PCR analizinde kullanılan primer/prob dizilimleri (Olmos ve ark., 2005)	57
Çizelge 3. 5. Real-time RT-PCR reaksiyon karışımı (AgPath-ID™, Applied Biosystems).....	58
Çizelge 3. 6. Melez kayısı çeşitlerinin ebeveyn kombinasyonları ve bu kombinasyonlardan DNA izole edilen bitki sayısı	60
Çizelge 3. 7. PPV dayanıklılık çalışmasında yapılan PCR analizinin reaksiyon karışımı	61
Çizelge 3. 8. PPV'ye dayanıklılığın moleküler markörlerle taranması çalışmasında kullanılan primer dizilimleri	62
Çizelge 3. 9. Fragment analizinin reaksiyon karışımı.....	63
Çizelge 4. 1. Fragment analizi yapılan toplam melez bitki sayısı ve PPV'ye dayanıklılık alleli içerdiği tespit edilen melez bitkilerin sayıları (%)	92
Çizelge 4. 1. (Devam) Fragment analizi yapılan toplam melez bitki sayısı ve PPV'ye dayanıklılık alleli içerdiği tespit edilen melez bitkilerin sayıları (%).....	92
Çizelge 5. 1. 'PPV- T ırkının bazı biyolojik özelliklerinin belirlenmesi' amacıyla yaprak bitleri ile yapılan deneysel taşıma denemelerinin içeriği ve sonuçları	92

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

bp	:Base pair (baz çifti)
M	:Molar
Mg	:Miligram
µl	:Mikrolitre
ml	:Mililitre
mM	:Milimolar
nM	:Nanomol
pH	:Power of hydrogen

KISALTMALAR

BAC	: <i>Bacterial</i> artificial chromosome
CP	:Coat protein
CT	:Treshold cycle
CTAB	:Cetyltrimethylammonium Bromide; Hexadecyltrimethylammonium bromide
d ₂ H ₂ O	:Çift destile su
DAS- ELISA	:Double antibody sandwich- ELISA
DNA	:Deoksiribonükleik asit
dNTP	:deoxynucleotide triphosphate
EDTA	:Disodium ethylenediamine tetraacetate
ELISA	:Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPPO	:European and Mediterranean Plant Protection Organization
EtBr	:Etidyum bromid
FAO	:Food and Agriculture Organization of The United Nations
HRM	:High Resolution Melting
IAPSC	:Inter-African Phyto-sanitary Council
KBY	:Kontrollü beslenme yöntemi
MAS	:Marker Asisted Selection

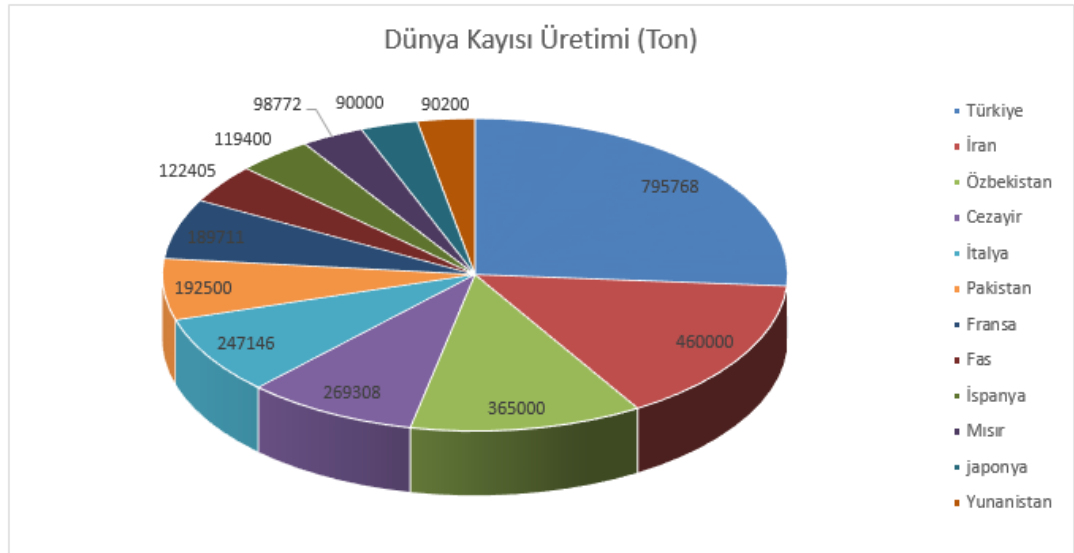
MgCl ₂	:Magnezyum klorür
NAPPO	:North American Plant Protection Organization
PBS	:Phosphate buffer saline
PCR	:Polymerase Chain Reaction
PNPP	:p-nitrophenyl phosphate (nitrofenil fosfat)
PPV	: <i>Plum pox virus</i>
PVP	:Polyvinylpyrrolidone
QTL	:Quantitative trait locus
RFLP	:Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	:Ribonükleik asit
RT	:Reverse Transcription
SBY	: Serbest beslenme yöntemi
SEO	:Stark Early Orange
SSR	:Simple Sequence Repeat
TAE	:Tris-acetate-EDTA
TE	:Tris- EDTA
TÜİK	:Türkiye İstatistik Kurumu

1. GİRİŞ

Yaz ortasında soframızda taze meyve olarak sevilip yendiği gibi kurusu, hoşafı, kompostosu, reçeli, marmeladı, şurubu, meyve suyu, şekerlemesi, pestili ve tatlısı da makbul sayılan kayısı meyvesini veren kayısı ağacı (*Prunus armeniaca* L.), *Prunus* cinsinin *Rosaceae* (gülgiller) familyasına dâhildir. Bazı kaynaklarda anayurdunun Çin, bazılarında da Doğu Anadolu olduğu belirtilen kayısı, Akdeniz havzası ülkelerinden, Kaliforniya'ya ve hatta Avustralya'ya kadar uzanan geniş coğrafyada yetiştirilmektedir. Kayısının anavatanı olmamasına karşılık iki bin yılı aşkın bir süreden beri bu topraklarda yetiştirilmesinden dolayı Anadolu kayısının ikinci vatanı haline gelmiştir.

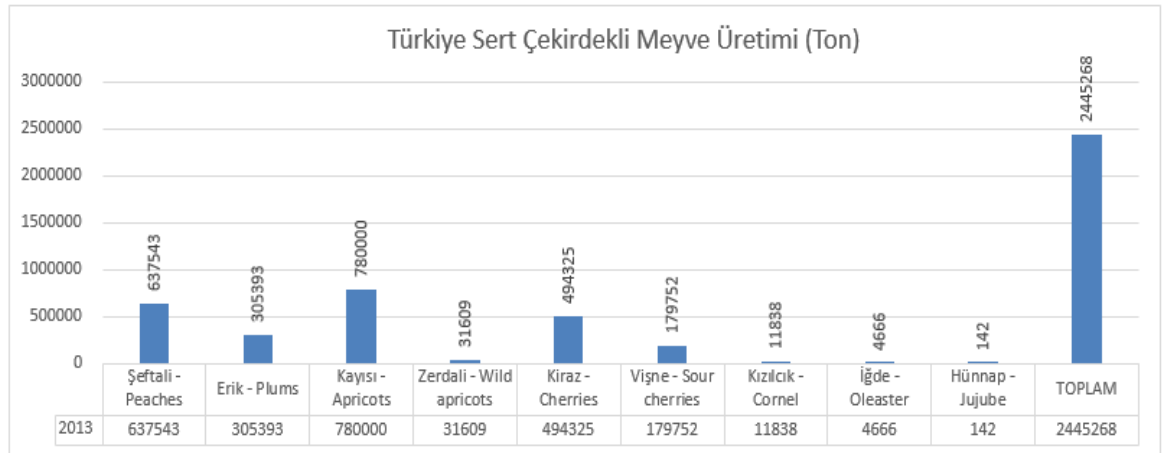
FAO (Food and Agriculture Organization of The United Nations) 2012 yılı üretim verilerine göre dünyadaki toplam kayısı üretimi yaklaşık 3.500.000 ton'dur. Bu üretimin büyük çoğunluğu başta Türkiye (795.768 ton) olmak üzere İran (460.000 ton), Özbekistan (365.000 ton), Cezayir (269.308 ton) ve İtalya (247.146 ton) tarafından gerçekleştirilmektedir (Anonymous, 2012) (Şekil 1. 1).

Türkiye'de, TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu) 2013 yılı verilerine göre 2.445.268 ton sert çekirdekli meyve üretimi mevcuttur ve bu üretimin 780.000 ton'unu kayısı oluşturmaktadır (Anonim, 2013a) (Şekil 1. 2).



Şekil 1. 1. Dünya kayısı üretimi (FAO, 2012)

Kayısı ülkemizde genel olarak sofralık ve kurutmalık olarak tüketilmektedir. Kayısı başta Malatya olmak üzere, Elazığ, Erzincan, Sivas, Kars, Iğdır illeri ile Ege, Akdeniz, İç Anadolu ve Marmara bölgelerinde üretilmektedir. Ülkemizde mevcut bulunan yerli çeşitler Hacıhaliloğlu, Hasanbey, Kabaası, Soğancı, Çataloğlu, Çöloğlu, Alyanak, Şalaz (Aprikoz), Şekerpare, Tokaloğlu-Erzincan, Tokaloğlu-Yalova, Tokaloğlu-Konya Ereğli, Şam, Turfanda İzmir, İri Bitirgen, İmrahor, Karacabey, Çiğli, Sakıt 2, Mahmudun Eriği, Adilcevaz 5, Turfanda Eskimalatya, Çekirge 52, Hacıkız, İsmailağa, Ethembey, Kuru Kabuk'tur. Ülkemizde üretilen kayısının önemli bir bölümü kurutulduktan sonra ihraç edilmekte geri kalanı büyük oranda sofralık olarak, bir kısmı da meyve suyu üretiminde sanayide kullanılmaktadır (Anonim, 2013b). Erkenci sofralık kayısı yetiştiriciliğimiz genelde dış kaynaklı çeşitler kullanılarak ülkemizin Akdeniz ve Ege kıyı şeridinde yapılmakta iken, kurutmalık kayısı yetiştiriciliğimizin çok önemli bir kısmı Malatya'da, neredeyse monokültür olarak yapılmaktadır. Malatya'da Hacıhaliloğlu (%73) ve Kabaası (%17) en çok yetiştirilen çeşitleri oluşturmaktadır (Asma, 2000).



Şekil 1. 2. Türkiye sert çekirdekli meyve üretimi (TÜİK, 2013)

Kayısı yetiştiriciliğinde ekonomik öneme sahip bazı hastalık ve zararlılar mevcuttur. En yaygın görülenleri; Rosellinia kök çürüklüğü (*Rosellinia necatrix* Prill.), kayısı sürgün ve dal yanıklığı (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van. Hall.), Armillaria kök çürüklüğü (*Armillaria mellea* Kummer), monilya (*Monilinia fructigena* Honey), Cytospora kanseri (*Leucostoma* spp.), yaprak delen- çil (*Coryneum beijerinckii*

Oudem), doğu meyve güvesi (*Cydia molesta* Busck), meyve ağacı dip kurtları (*Capnodis* spp. Fischer von Waldheim), yaprak bitleri (*Myzus persicae* Sulzer.; *Hyaloptyerus pruni* Geoffroy.), kırmızı örümcekler (*Tetranychus viennensis* Zacher.; *Tetranychus urticae* Koch.; *Panonychus ulmi* Koch.)’dir (Anonim 2010). Sert çekirdekli meyve üretimini kalite ve ürün miktarı yönünden olumsuz etkileyen başta *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Prune dwarf virus* (PDV), *Apple chlorotic ringspot virus* (ACLSV) ve *Cherry leaf roll virus* (CLRV) olmak üzere birçok virüs hastalığı bulunmasına rağmen *Plum pox virus* (PPV)’ün sebep olduğu Sharka (Şarka) hastalığı sert çekirdekli meyvelerin en önemli virüs hastalığıdır (Sutic ve ark., 1999).

Plum pox virus, *Potyviriidae* familyasının *Potyvirus* cinsine aittir (Levy ve ark., 2000; Garcia ve Cambra, 2007). PPV, 760 x 20 nm boyutlarında çok kıvrımlı, ipliğimsi bir partiküle sahip, pozitif anlamlı tek kollu RNA (ssRNA) içeren, 9741-9795 nükleotidden oluşan, partiküllerinin %7’si nükleik asit ve %93’ü protein olan bir virüstür (Kegler ve Schade, 1971; Cervera ve ark., 1993; Garcia ve ark., 2014). PPV’nin bilinen sinonimleri, *Prunus virus 7*, *Annulus pruni*, *Sharka virus*, *Prunus broad streak and ringspot variegation virus*’dur (Glasa ve Candresse, 2005).

Günümüzde PPV’nin sekiz ırkı tanımlanmıştır (Garcia ve ark., 2014). Bunlar; PPV-M (Marcus), PPV-D (Dideron) (Kerlan ve Dunez., 1979), PPV-EA (El Amar) (Wetzel ve ark., 1991), PPV- C (Cherry) (Nemchinov ve ark., 1996), PPV-W (Winona) (James ve Varga., 2005), PPV-Rec (Recombinant) (Glasa ve ark., 2004), PPV-T (Turkey) (Ulubaş Serçe ve ark., 2009) ve PPV-CR (Glasa ve ark., 2013) ırklarıdır.

PPV, ekonomik olarak özellikle kayısı, erik ve şeftalilerde önemli zararlara yol açmaktadır. Hastalıklı bitkilerde meyvelerin ağırlığı % 21- 34, şeker içeriğı % 0,14- 2,11 oranında azalmakta ve asit oranı artmaktadır (Nemeth, 1986). PPV şeftalilerde yaprak, meyve ve bazı çeşitlerin çiçek taç yapraklarında simptom gösterirken, kayısı ve erik ağaçlarında ise yaprak, meyve ve meyve çekirdeklerinde değışik şekillerde belirtilere yol açmaktadır. PPV genel olarak meyve ağaçlarının yapraklarında klorotik bantlar, damar açılması, halka şeklinde beneklenme ve şekil bozukluğu; meyvede şekil bozukluğu ve çekirdekte halka şeklinde beneklenmeler; gövdede çatlamalar; çiçeklerde renk kırılması gibi karakteristik belirtiler göstermektedir. Genel olarak PPV, meyvenin pazar değerinin düşmesine neden olmaktadır (Lopez-Moya ve ark., 2000).

Hastalığın en yaygın görüldüğü Avrupa’da 100 milyondan fazla sert çekirdekli meyve ağacı enfekteli durumdadır. PPV, IAPSC (Inter-African Phyto-sanitary Council), NAPPO (North American Plant Protection Organization) ve EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) tarafından karantinaya tabi olup, bu virüsün bulunduğu ülkelerde hastalığın yayılmasını önlemek için oldukça ciddi sertifikasyon ve eradikasyon çalışmaları yürütülmektedir. Son 30 yıl boyunca Şarka yönetiminin tüm dünyadaki maliyetinin 10. 000 milyon Avro’yu geçtiği hesaplanmaktadır (Cambra ve ark., 2006). PPV’nin, mekanik inokulasyon ve aşı ile taşındığı yapılan çalışmalarla ortaya konurken, *Prunus* konukçuları arasında temasla, polenle ve tohumla taşınmadığı belirtilmiştir (Garcia ve ark., 2014). PPV’nin taşınmasında en etkili faktör *Aphididae* familyasında yer alan yaprak bitleri (*Aphis craccivora*, *Aphis spiraecola*, *Brachycaudus helichrysi*, *Brachycaudus cardui*, *M. persicae*, *Myzus varinas*, *Myzus (Phrodon) humuli*) ile olmaktadır. PPV, yaprak bitleri ile non-persistent olarak taşınmaktadır (Ng ve Falk, 2006). PPV’nin esas doğal vektörleri *B. helichrysi*, *M. persicae* ve *M. (Phrodon) humuli*’dir. Virüs, *Aphophora alni*, *Edwardsonia plebeja*, *Lecanium corni*, *Lygus pratensis*, *Macrosteles laevis*, *Myzus ceraci*, *Olianus quinquecostatus*, *Paratetranychus pilosus*, *Typhlocyba rosae* ile taşınmamaktadır (Büchen-Osmond, 2006). *Hyalopterus pruni*’nin, Büchen-Osmond (2006) tarafından PPV’nin vektörü olmadığı belirtilirken, Gildow ve ark. (2004) ve Labonne ve Dallot (2006) tarafından da PPV’nin asıl vektör türleri arasında belirtilmektedir.

PPV vektörü olma ihtimali bulunan yaprak biti popülasyonlarının araştırıldığı bir çalışmada Pensilvanya’daki şeftali bahçelerinde iki yıl süresince araştırılmıştır. yaprak bitleri su tuzakları kullanılarak yakalanmış ve en çok oranda tespit edilen yaprak bitlerinin *Rhopalosiphum maidis*, *A. spiraecola* ve *M. persicae* olduğu tespit edilmiştir (Wallis ve ark., 2005).

Yunanistan’da yapışkan sürgün yöntemi ile gerçekleştirilen diğer bir çalışmada arazide kayısı ağaçlarında *A. gossypii* ve *H. pruni* en çok rastlanan yaprak biti türleri olmuş, PPV epidemiyolojisinde bu yaprak biti türlerinin rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (Varveri, 2006).

PPV'nin potansiyel vektörü olan yaprak bitleri ile otsu konukçulara ve *Prunus* türlerine taşınması konularında bazı çalışmalar bulunmaktadır. Deneysel taşımada kullanılan metodların etkinliği ve taşınma epidemiyolojisini (kapsamında “serbest beslenme yöntemi” (SBY) ve “kontrollü beslenme yöntemi” (KBY) olmak üzere iki farklı taşıma denemesi temel alınmıştır (Labonne ve ark. 1995). SBY ile kurulan denemelerde *Aphis fabae*, *A. gossypii*, *A. spiraecola*, *M. persicae* ve *Rhopalosiphum padi* yaprak bitlerinin PPV'yi etkin olarak taşıdığı bildirilmiştir. KBY ile yapılan denemelerde ise *A. spiraecola* ve *M. persicae* yaprak bitlerinin PPV'yi etkin olarak taşıdığı bildirilmiştir. *Prunus*'dan *Prunus*'a gerçekleştirilen PPV taşıma denemelerinde KBY ve SBY kullanılmıştır. İki PPV izolatı (PPV V ve PPV BT) ve iki taşıma denemesi yöntemi kullanılarak yapılan denemelerde *H. pruni* ile PPV taşıması gerçekleştirilememiştir. Yapılan tüm taşıma denemeleri sonucunda en etkili PPV taşıma yönteminin “serbest beslenme yöntemi” ile olduğu bildirilmiştir.

Kuzey Amerika'da doğal olarak bulunan 13 farklı yaprak biti türü ile gerçekleştirilen PPV'nin deneysel taşınması çalışmasında *A. fabae*, *A. spiraecola*, *Brachycaudus persicae*, *Metopolophium dirhodum*, *M. persicae*, *R. padi* ve *Toxoptera citricida*'nın virüsü taşımada başarılı olduğu bildirilmiştir (Gildow ve ark., 2004).

PPV-Rec izolatlarının (BOR-3, BULG, Horomerice ve 143A) *M. persicae* ile taşınması etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada denemeler Labonne (1995) tarafından uygulanmış olan KBY'ye göre kurulmuştur. Denemeler sonunda gerçekleştirilen DAS-ELISA analizlerine göre farklı izolatların farklı *Prunus* konukçularında birbirinden bağımsız taşınma oranları ortaya koyduğu tespit edilmiştir. BOR-3, BULG, Horomerice ve 143A izolatlarının *Prunus* konukçularına sırasıyla %35, %28, %80 ve %5 oranlarında *M. persicae* ile deneysel olarak taşınabildiği bulunmuştur (Galasa ve ark., 2004).

Capote ve ark., (2010) tarafından gerçekleştirilen *M. persicae* ile PPV-M'nin deneysel taşınması çalışmasında, enfeksiyon kaynağı olarak kullanılan GF305'den, GF305 anacına ve Calante, Mercil ve Royal Glory kültüvarlarına sırasıyla %66.7 ve %46.7, %26.7 ve %26.7 oranlarında *M. persicae* ile PPV-M'nin taşındığı bildirilmiştir. Ayrıca enfeksiyon kaynağı olarak kullanılan Gladys kültüvarından sağlıklı GF305 kültüvarına %20.0, Mercil kültüvarına %13.3, Calante kültüvarına %26.7 ve Royal

Glory kültüvarına da %0.0 oranlarında *M. persicae* ile PPV-M'nin taşındığı bildirilmiştir.

Manachini ve ark. (2007) tarafından gerçekleştirilen *M. persicae* ile PPV-M'nin otsu konukçulara taşınma çalışmasında yapılan RT- PCR analizleri sonrasında 15 adet otsu konukçu türünden 10 türe ait indikatörlerin PPV-M ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Otsu indikatör olarak kullanılan *P. sativum*, *M. chamomilla* ve *B. perennis* türlerine ait test bitkilerinin taşıma denemesinde %100 oranında PPV-M ile bulaşık olduğu belirtilmiştir.

Ülkemizde Ankara ili ev bahçelerinde 1995-2002 yıllarında yürütülen gözlemlerde, PPV enfekteli ağaçlarda sadece *H. pruni* tespit edilmiştir. Bu yaprak biti türüyle GF-305 fidanlarına gerçekleştirilen taşıma denemeleri sonucunda yaprak biti ile inokulasyondan 54 gün sonra belirtilen semptomlar gözlendiği ve yapılan DAS-ELISA (Double antibody sandwich- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) testlerinde pozitif reaksiyonlar alındığı bildirilmiştir (Elibüyük, 2003). ağlayan ve ark. (2013) tarafından Ege Bölgesi'nde PPV enfekteli kayısı bahçesinde yürütülen çalışmada, PPV enfekteli ağaçlar üzerine konulan yapışkan tuzaklarla iki yıl süresince yapılan gözlemlerde yaygın bulunan yaprak biti türlerinin tespiti yapılmaya çalışılmıştır. Ardarda iki yıl süresince yapılan gözlemlerde *M. persicae* (%20.15), *H. pruni* (%18.64), *A. craccivora* (%9.04) ve *A. gossypii* (%8.36)'nin yaygın olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Real-Time RT-PCR (Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction; Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi ile gerçekleştirilen analizlerde, *M. persicae* %34.78, *H. pruni* %32.50, *Macrosiphum euphorbiae* %25.00, *A. gossypii* %23.80, *A. spiraeicola* %12.50 ve *A. craccivora*'nın %10.00 oranlarında PPV'yi bünyelerinde bulundurduğu bildirilmiştir.

PPV ile mücadelenin en önemli yolu sağlıklı bitki materyali üretmek, dayanıklı çeşit kullanmak ve hastalığın yayılmasında etkisi olan faktörleri önlemeye çalışmaktır. PPV'ye dayanıklı çeşitlerin belirlenmesi ile ilgili dünyada çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Kayısılarda PPV'ye dayanıklılıkla ilgili oluşturulan yeni nesil haritalar, PPVres (resistant) lokusunun daha iyi bir şekilde lokalize edilmesine izin veren ko-dominant basit dizi tekrarı (simple sequence repeat; SSR) markörleriyle oluşturulmuştur (Lambert ve ark., 2007; Soriano ve ark., 2008; Lalli ve ark., 2008; Marandel ve ark.,

2009a; Pilarova ve ark., 2010; Dondini ve ark., 2010). PPVres bölgesinde toplam 42 SSR primer çifti düzenlenmiş, Markör aracılığıyla seleksiyon (MAS: marker asisted selection) için standardize edilmesi amacıyla, haritalama için hem SEO (Stark Early Orange) hem de Goldrich kökenli melezlerde polimorfik olan sadece 7 SSR markörü (PGS1.03, PGS1.20, PGS1.21, PGS1.23, PGS1.24, PGS1.252 ve 96P10_SP6) seçilmiştir. Geliştirilen SSR markörlerinin, PPVres ile ilgili dayanıklılık gen bölgeleri için olduğu ve test edilen bütün dayanıklılık kaynaklarında ortak olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle söz konusu markörlerin, bütün dayanıklı çeşitlerin döllerinde de MAS için uygun olabileceği belirtilmektedir (Soriano ve ark., 2012). PPV'ye dayanıklılık ile ilgili birçok araştırma yapılmış ve bu güne kadar yapılan çalışmalarda Goldrich, Harcot, SEO, Lito, Harlayne, Stella, OrangeRed, NJA2 kayısı çeşitlerinin doğal olarak PPV dayanıklılık genini taşıdığı belirtilmiştir (Decroocq ve ark., 2013).

İnönü Üniversitesi Kayısı Araştırma Merkezi tarafından yeni kayısı çeşitleri geliştirilmesi amacıyla kapsamlı bir ıslah çalışması başlatılmıştır. “Çok Amaçlı Kayısı Islah Projesi” kapsamında; erken ve geç olgunlaşan yeni sofralık çeşitler, verim ve kurutma randımanı yüksek yeni kurutmalık çeşitleri ve Şarka hastalığına dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi konusunda melezleme ıslah çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmalar kapsamında Şarka'ya dayanıklı olduğu bilinen SEO, Harcot, Goldrich ve Stella ile yerel kayısı çeşitleri melezlenmiştir. Bu güne kadar Şarka'ya dayanıklılık amacıyla elde edilen yaklaşık 3400 melez arazi koşullarına aktarılmıştır. Bunların arazi koşullarında dayanıklılık testine tabi tutulması büyük bir külfet anlamına gelmekle birlikte, PPV'nin karantina patojeni olması nedeniyle arazide bu melezlere PPV inokulasyonu yapmak da imkânsız durumdadır. Ulubaş Serçe ve ark. (2013b) bazı yerli kayısı çeşitlerinde ve onların melezlerinde moleküler markörler aracılığıyla PPV dayanıklılığını araştırmışlardır. Çalışma kapsamında PGS1.21 ve PGS1.23 markörlerini kullanmış, Hacıhaliloğlu, Kabaası, Hasanbey, Çöloğlu, Adilcevaz5, Şekerpare, Mahmudun Eriği ve Çataloğlu gibi yerli kayısı çeşitlerini içeren toplam 180 kayısı melezini taramışlardır. Markörlerle taranan hiçbir yerli kayısı çeşidinde PPV dayanıklılığını teşvik eden allele rastlanmadığı bildirilmiştir.

Türkiye'ye özgü bir ırk olduğu bilinen PPV-T'nin biyolojik özellikleri, özellikle vektör yaprak bitleri ile taşınma etkinlikleri detaylı bilinmemektedir. Ayrıca PPV'nin

Ülkemizde varlığının bilinmesinden dolayı, virüsün yayılma ihtimaline karşılık mücadele yöntemleri ve dayanıklı çeşitlerin ıslahı konularında yapılan çalışmalar günümüzde gittikçe önem kazanmaya başlamıştır.

Yapılan bu çalışma iki temel kapsam içerisinde yürütülmüştür..

1. ‘*Plum pox virus* (PPV) T ırkının bazı biyolojik özelliklerinin belirlenmesi’,
2. ‘Melez kayısı bitkilerinde PPV’ye dayanıklılığın molekr markörlerle araştırılması’.

PPV-T ırkının bazı biyolojik özelliklerinin belirlenmesi çalışmasında, Labonne ve ark. (1995)’ a göre ‘serbest beslenme yöntemi’ (SBY) ve ‘kontrollü beslenme yöntemi’ (KBY) olmak üzere iki farklı taşıma denemesi yöntemi kullanılarak yaprak bitleri ile PPV-T’nin deneysel taşınma etkinliği belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen bulguların, şu ana kadar sadece ülkemizde varlığı bilinen PPV-T ırkının ülkemizde yayılmasının takibi, PPV’ye karşı alınabilecek önlemler ve PPV-T’nin biyolojik özelliklerinin belirlenmesi konularına temel oluşturulması hedeflenmiş ve dünyada ekonomik öneme sahip olan PPV ile ilgili yapılan çalışmalara katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Melez kayısı bitkilerinde PPV’ye dayanıklılığın molekr markörlerle araştırılması kapsamında yapılan çalışmalarda, Malatya’da yerli kayısı eşitleri ile şarka’ya dayanıklı olduğu bilinen çeşitlerin melezlenmesinden elde edilen ve arazi koşullarına aktarılmış olan melez bitkiler arasından şarka’ya dayanıklı bireylerin SSR markörler aracılığıyla seleksiyon (MAS)’u amaçlanmıştır. Elde edilen veriler ile fenotipleme gibi uzun soluklu ve külfetli olan arazi denemeleri öncesinde PPV’ye karşı dayanıklılık alleli içeren melezlerin kısa sürede tespit edilebilmesi hedeflenmiştir. Böylece PPV’ye dayanıklılık konularında yapılacak olan melezleme çalışmalarının hızlanması ve PPV’ye dayanıklı yeni çeşitlerin kısa zamanda geliştirilmesine katkı sağlanması amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Plum pox virüs (PPV) *Potyviriidae* familyasına ait olup, şeftali, erik, kayısı ve kiraz gibi çeşitli ticari *Prunus* türlerini etkileyerek Şarka (Sharka) hastalığına sebep olan bir virüs hastalığıdır (Levy ve ark., 2000; Garcia ve Cambra, 2007; Garcia ve ark., 2014). Günümüzde PPV'nin sekiz ırkı tanımlanmıştır (Garcia ve ark., 2014). Bunlar; PPV-M (Marcus), PPV-D (Dideron) (Kerlan ve Dunez., 1979), PPV-EA (El Amar) (Wetzel ve ark., 1991), PPV- C (Cherry) (Nemchinov ve ark., 1996) , PPV-W (Winona) (James ve Varga., 2005), PPV-Rec (Recombinant) (Glasa ve ark., 2004), PPV-T (Turkey) (Serçe ve ark.,2009) ve PPV-CR (Glasa ve ark., 2013) ırklarıdır. Genellikle kayısı ve erikte tespit edilen PPV-D Avrupa'da yaygın olan bir ırktır. Ancak bazı çalışmalarda PPV-D'nin Avrupa'nın dışında da bulunabildiği belirtilmiştir (Damsteegt ve ark., 2001; Reyes ve ark., 2003). Avrupa dışında varlığı ile ilgili henüz bir veri bulunmayan PPV-M ise genel olarak güney ve merkez Avrupa ülkelerinde yaygın olarak bulunmaktadır (Myrta ve ark., 2001; Dallot ve ark., 2011). Varlığı sadece Mısır ile sınırlı kalmış olan PPV- EA ırkı, kayısı, şeftali ve Japon Eriği'nde tespit edilmiştir (Matic ve ark., 2011). İlk olarak vişnede varlığı tespit edilen PPV-C ırkı (Nemchinov ve ark., 1996), daha sonraları İtalya'da (Crescanzi ve ark., 1997; Fanigliulo ve ark., 2003), Macaristan'da (Nemchinov ve ark., 1998), Beyaz Rusya'da (Malinowski ve ark., 2012) ve Hırvatistan'da (Kajic ve ark., 2012) vişne ve kirazda tespit edilmiştir. Genetik sınıflandırmada PPV-M ve PPV-D ırkına benzerlik gösteren PPV-Rec ırkı (Glasa ve ark., 2002), Avrupa'nın bir çok ülkesinde ve Avrupa dışında da genel olarak kayısı ve erik ağaçlarında tespit edilmiştir (Glasa ve ark., 2002, 2004; Candresse ve ark., 2007; Matic ve ark., 2006; Thompson ve ark., 2009). Farklı bir ırk olan ve PPV-W ırkının tespit edilmesine temel oluşturan PPV-W3174 orijinal olarak ilk kez 2003 yılında James ve Varga (2005) tarafından Kanada'da erik ağacında tespit edilmiştir. Sonraları PPV-W izolatları Letonya, Ukrayna ve Rusya'da tespit edilmiştir (Glasa ve ark., 2011; Mavrodieva ve ark., 2013; Sheveleva ve ark., 2012). PPV-W açık arazide erik, karaçalı, Kanada eriği ve kiraz eriğinde tespit edilmiştir (Mavrodieva ve ark., 2013). Bugüne kadar sadece Türkiye'de varlığı bilinen PPV-T'nin izolatları genellikle kayısı ve erikte tespit edilmiştir (Ulubaş Serçe ve ark., 2009). Ayrıca, SharCo FP7 projesi kapsamında Arnavutluk'da gerçekleştirilen çalışmalarda PPV-T tespit edildiği

bildirilmiştir (Garcia ve ark., 2014). Glasa ve ark., (2013) tarafından son olarak belirlenen ırk olan PPV- CR ırkı Rusya’da vişnelerde tespit edilmiştir.

Diğer tüm virüs hastalıklarında olduğu gibi PPV’nin de kimyasal mücadelesi olmadığından dünyada dayanıklı ve hassas çeşitlerin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Ayrıca hastalığın yayılması ile ilgili önlemler alabilmek için hastalığı yaygın olarak taşıyan vektörlerin tespiti ile ilgili de çeşitli çalışmalar yürütülmüştür (Labonne ve ark., 1996). Ülkemizde bulunan ve diğer ülkelerde varlığına henüz rastlanmamış olan PPV-T’nin biyolojik özellikleri hakkında henüz kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır.

2.1. Türkiye’de PPV’nin Varlığı, PPV’nin Biyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi ve PPV’ye Dayanıklılık ile İlgili Yapılan Çalışmalar

PPV’nin varlığı Türkiye’de ilk kez Edirne’de Şahtiyancı (1968) ve daha sonraları da Ankara’da Kurçman (1973) tarafından simptomolojik gözlemlere dayanılarak kaydedilmiştir.

Yürektürk (1984) Marmara Bölgesi’nde şeftali, erik, kayısı ve badem de yaptığı sörveyler sonrası biyolojik indeksleme yöntemi ile 345 örneğin 34’ünde PPV enfeksiyonu tespit etmiştir.

Ankara ve çevresindeki sert çekirdekli meyvelerde simptomolojik gözlemler, mekanik inokulasyonlar ve serolojik testler sonucu PPV’nin yaygın olduğu ve erik ve kayısılardaki yoğun meyve dökümünün bu virüsten kaynaklandığı bildirilmiştir (Elibüyük ve Erdiller, 1995).

Sertkaya ve ark. (2003) ‘Türkiye’de PPV’nin DAS-ELISA ve RT-PCR/ RFLP (Restriction fragment lenght polymorphisim) analizi ile saptanması ve tanılanması’ çalışmasında, Malatya yöresi dışında kalan ülkemizin önemli yetiştiricilik bölgelerindeki kiraz, erik, kayısı, nektarin, şeftali, badem, vişne ağaçlarından tesadüfi örnekleme yapmıştır. RT-PCR/RFLP analizi ile DAS-ELISA ve DAS-ELISA bulgularını destekleyen sonuçlar elde edilmiştir. Toplam 52 örnekten iki adedinin PPV ile enfekteli olduğu ve bu iki kayısı izolatının da M ırkı olduğu belirlenmiştir.

Koç ve Baloğlu, (2006), erik bahçeleri üzerine yaptıkları çalışmada klorotik leke, meşe yaprağı benzeri renk açılmaları, yapraklarda şekil bozuklukları ve çizgi şeklinde

renk açılmalarının PPV- M ırkı ile bağlantılı olduğunu DAS-ELISA, RT-PCR ve RFLP yöntemleri ile saptamış ve aynı çalışmada araştırmacılar PPV'nin Çukurova Bölgesi için ilk kayıt olduğunu bildirmişlerdir.

Ulubaş Serçe ve ark. (2009) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, Ankara ve çevresinde PPV enfeksiyonunun tespit edildiği bahçelerden izole edilen örneklerin nükleotid dizisi belirlenmiş, rekombinasyon tespit edilmiş ve bu yeni ırka T (Türkiye) adı verilmiştir. PPV-T izolatu günümüze değin sadece ülkemizde saptanmıştır.

Bursa, Çanakkale, İzmir, Aydın, Afyon, Kütahya ve Manisa illerindeki şeftali, kayısı, kiraz ve erik bahçelerinde 2004, 2005, 2006 yıllarının büyüme sezonunda sert çekirdekli meyvelerde bulunan virüs ve viroidlerin tespiti için sörvey çalışması yapılmıştır. Yapılan çalışmada nekrotik lekeler ve meyvede şekil bozuklukları gösteren ağaçlardan toplam 1225 örnek alınmış ve çeşitli virüsleri tespit amaçlı ELISA testi yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda örneklerin %0.4 oranında PPV yönünden pozitif olduğu tespit edilmiştir (Gümüş ve ark., 2007).

Gazel ve ark. (2010), 2006 yılında Mersin ilinden erik, şeftali, kayısı, nektarin bahçelerinden alınan 37 örnekten 30'unun ve Hatay ilinde erik, şeftali, kayısı, nektarin bahçelerinden alınan 196 örnekten 110 tanesinin PPV yönünden pozitif olduğunu bildirmiştir.

2007 ve 2010 yılları arasında Akbaş ve ark. (2011) Türkiye'nin birçok ilini kapsayan sörvey çalışması yapmıştır. Bu çalışmada ticari ve ticari olmayan taş çekirdekli meyve bahçeleri ile fidanlıklardan alınan 5762 örneğe yapılan DAS-ELISA ve RT-PCR analizleri sonucunda Ege Bölgesi'nde 3, İç Anadolu'da 22, Marmara'da 128 ve Akdeniz'de 73 olmak üzere toplam 226 adet örneğin PPV yönünden pozitif olduğu bildirilmiştir.

Comart ve ark. (2013) tarafından PPV'nin D, M ve T ırkları High Resolution Melting (HRM) eğrisi analizleri ile araştırılmış ve PPV genomunun farklı bölgelerini çoğaltan 23 primer çifti düzenlenmiştir. Çalışmada kullanılmak üzere 10 örnek PPV-D izolatu sadece Ortaköy'den, 10 örnek PPV-M izolatu Isparta, Hatay, Kayseri, Çanakkale illerinden ve 10 örnek PPV-T izolatu Ankara, Kayseri, Konya illerinden temin edilmiştir. Yapılan çalışmayla düzenlenen 23 primer çiftinden yirmi birinin çok iyi sonuç verdiği ve bunlardan on yedi tanesinin PPV'nin üç ırkı için kısmen veya tamamen ayırt edici nitelikte olduğu bildirilmiştir.

Gürcan ve ark. (2013a) Ankara'ya komşu olan Aksaray, Kayseri, Nevşehir, Yozgat ve ana yol üzerindeki küçük yerleşim yerlerinde sörvey çalışması yapmışlardır. Toplanan 120 örnek ELISA ve RT-PCR analizleri yapılmış ve Ankara, Kayseri ve Konya'daki genellikle kayısı ve bazı erik ev bahçelerinde PPV enfeksiyonu tespit edilmiştir. Aksaray, Nevşehir, Yozgat'ın şehir merkezlerinde ve ana yol üzerindeki yerleşim yerlerinde PPV enfeksiyonu bulunmamıştır. Bu durum PPV'nin genellikle enfekteli bitki materyalleri ile yayıldığını göstermiştir. Özellikle Kayseri'de gözlem yapılan ev bahçelerinde enfekteli kayısılarla aynı bahçede bulunan bademlerde herhangi bir semptom gözlenmediği bildirilmiştir. Bu da göstermektedir ki PPV-T enfeksiyonu genellikle kayısı ve eriklerle sınırlı kalmıştır.

Ulubaş Serçe ve ark. (2013a) tarafından Türkiye'deki PPV izolatlarının çeşitliliği ile ilgili bir çalışma gerçekleştirilmiştir. PPV'nin genetik çeşitliliği Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden çeşitli ticari bahçelerde, ev bahçelerinde veya şehir parklarında bulunan taş çekirdekli meyve türlerinden toplanan 63 örneğin analizi ile değerlendirilmiştir. PPV izolatları (Cter)P3-6K1-(Nter)Cl kodlama bölgesi ve N1b bölgesinin 5' sonu ile birlikte kılıf proteininin (coat protein; CP) 3' terminal bölgesini kapsayan iki genomik fragmentin kullanımıyla çeşitlendirilmiştir. Her iki amplikon sekanslanmış ve filogenetik analizler göstermiştir ki 30 PPV izolatı PPV-M, 32 PPV izolatı PPV-T ve bir izolat da PPV-M+D'dir. Yapılan çalışma sonucunda PPV'nin Türkiye'deki yerli izolatının PPV-T olduğu belirlenmiş, PPV-M'nin yeni yayılmaya başladığı kaydedilmiştir. Ayrıca PPV-D izolatının yalnız bulunmadığı, sadece PPV-M izolatı ile karışık enfeksiyon yaptığı bildirilmiştir.

Gürcan ve ark. (2013b) tarafından yapılan bir başka çalışmada Ortaköy, Aksaray'da PPV enfekteli olduğu bilinen bahçelerden alınan 50 örneğe ELISA ve RT-PCR analizleri yapılmıştır. 21 örneğin P3-6K1 bölgeleri çoğaltılmış ve iki yönlü sekans analizi yapılmıştır. 21 örnekten 19 tanesinin spesifik diziye sahip olduğu bulunmuştur. Çalışmanın sonucunda, Gen bankası verileri ile yapılan dizi analizinin PPV-D ile eşleştiği belirtilmiştir.

Ceylan ve ark. (2013) birbirine uzak olan Çanakkale, Hatay, Isparta ve Kayseri illerinden topladıkları 10 örneğe PPV-M ve PPV-D spesifik antiserum kullanarak ELISA ve RT-PCR analizleri yapmıştır. P3-6K1 proteini içeren virüs genomunun fragmenti çoğaltılmış ve sekans analizi yapılmıştır. 10 örnek için 805b ürünleri,

önceden yayınlanan sekanslar ve önceden araştırdıkları 30 PPV-T izolatının P3-6K1 bölgesi ile eşleştirilmiştir. Filogenetik eşleştirme, bahçelerden toplanan izolatların PPV-M olduğunu ve bunların büyük şehirlerin ev bahçelerinde bulunan PPV-T izolatlarının P3-6K1 bölgelerinden farklı olduğunu göstermiştir. Bu çalışma ile Türkiye’de yaygın olan izolatın PPV-T olduğu ancak PPV-M’nin tüm karantina önlemlerine rağmen ülkemize yurt dışından alınan fidanlarla girdiği bildirilmiştir.

Kaya ve ark. (2014) Antakya, Hatay’da PPV enfekteli bir bahçenin yakınına PPV’den ari olan sertifikalı *Prunus* anaçlarıyla tesis ettikleri bir bahçede 2 yıl boyunca PPV’nin yaprak bitleri ile taşınmasını gözlemlemişlerdir. Yapılan DAS-ELISA analizleri sonunda PPV enfeksiyonu tespit ettikleri Myrobalan 29C (*P. cerasifera*) bitkilerine yaptıkları sekans analizinde, enfeksiyonun PPV-M ırkından kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Ankara ili ev bahçelerinde 1995- 2002 yıllarında yürütülen gözlemlerde, PPV enfekteli ağaçlardan sadece *H. pruni* tespit edilmiştir. Bu yaprak biti türüyle GF-305 fidanlarına gerçekleştirilen taşıma denemeleri sonucunda yaprak biti ile inokulasyondan 54 gün sonra belirtiler gözlemlendiği ve yapılan DAS-ELISA testlerinde pozitif reaksiyonlar alındığı bildirilmiştir (Elibüyük, 2003).

Çağlayan ve ark. (2013) tarafından Ege Bölgesi’nde PPV enfekteli kayısı bahçesinde yürütülen çalışmada, PPV enfekteli ağaçlar üzerine konulan yapışkan tuzaklarla iki yıl süresince yapılan gözlemlerde yaygın bulunan yaprak biti türlerinin tespiti yapılmaya çalışılmıştır. Artarda iki yıl süresince yapılan gözlemlerde *M. persicae* (%20.15), *H. pruni* (%18.64), *A. craccivora* (%9.04) ve *A. gossypii* (%8.36)’nin yaygın olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Real-Time RT-PCR (Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction; Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi ile gerçekleştirilen analizlerde, *M. persicae* %34.78, *H. pruni* %32.50, *Macrosiphum euphorbiae* %25.00, *A. gossypii* %23.80, *A. spiraecola* %12.50 ve *A. craccivora*’nın %10.00 oranlarında PPV’yi bünyelerinde bulundurduğu bildirilmiştir.

Antakya, Hatay’da doğal olarak PPV enfekteli nektarin bahçesinin yakınına Myrobolan 29C (*P. cerasifera*), Garnem (*Prunus dulcis* × ((*P. persica* × *Prunus davidiana*) × *P. persica*)), GF677 (*Prunus amygdalus* × *P. persica*), Docera 6 (*P. domestica* × *P. cerasifera*), Greenpac ((*P. persica* × *P. davidiana*) × (*P. dulcis* × *P. persica*)) ve Adesoto 101 (*Prunus insititia*) türleri ile tesis edilen deneme bahçesinde iki

yıl süresince yapılan gözlemlerde yaygın bulunan yaprak bitlerinin tespiti ve PPV taşıma oranları araştırılmıştır. Buna göre, *M. persicae* %39.47, *A. fabae* %25.00, *A. gosypii* %24.56, *A. spiraeicola* %22.60, *H. pruni* %22.22, *Macrosiphon euphorbiae* %20.00 ve *A. craccivora*'nın %8.00 oranlarında yaygın bulunduğu bildirilmiş, yapılan squash real-time RT-PCR analizlerinde *A. spiraeicola*'nın %12.5, *A. gossypii*'nin %12.42 ve *H. pruni*'nin %11.11 oranlarında PPV'yi bünyelerinde bulundurduğu tespit edilmiştir (Kaya ve ark., 2014).

Ülkemizdeki yerli kayısı çeşitlerinin PPV'ye karşı reaksiyonları konusunda çalışmalar sınırlı kalmıştır. Elibüyük ve Erdiller (1991) yerli çeşitler üzerinde yaptıkları bir çalışmada, 8 kayısı ve 12 erik çeşidinin arazideki yaprak meyve ve gövde simptomlarını gözlemlemiş, cv. Can erik çeşidi hariç tüm çeşitlerde hastalık symptomu belirdiğini bildirilmişlerdir.

Ülkemiz kayısı çeşitleri ile yurt dışında yapılan bir çalışmada Çöloğlu, Hacıhaliloğlu, Hasanbey, Karacabey ve Tokaloğlu çeşitleri PPV-M ve PPV-D ırklarına hassas olduğu bildirilmiştir (Dosba ve ark., 1992).

Elibüyük ve Erdiller (1995) Bursa'dan temin edilen Aprikoz, Çöloğlu, Hacıhaliloğlu, Tokaloğlu ve Şam yerli kayısı çeşitlerine herhangi bir inokulasyon yapmadan doğal olarak enfektelenen ağaçlarda dört yıl süre ile gözlemler yapmışlar ve sonuç olarak bu çeşitlerin PPV'ye hassas olduklarını bildirmişlerdir. Ancak yaptıkları çalışmada virüs ırkını belirtmemişlerdir.

Çağlayan ve ark. (2004) Türkiye'deki yerli kayısı ve erik çeşitlerinin PPV'ye reaksiyonu ile ilgili Macaristan Erd-Elvira Meyve ve Süs Bitkileri Araştırma Merkezi'nde bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu çalışma kapsamında doğal olarak PPV enfekteli olan 10 yıllık anaçlar üzerine yerli Türk kayısılarından Alyanak, Tokaloğlu, Hacıhaliloğlu, Soğancı, Hasanbey, Şekerpare, Kabaaşı, Sakıt-2, 11/89 çeşidi, Çataloğlu, Çöloğlu, Mahmuduneriği, Hacıkız ve yerli eriklerden de Alerik, Can-2, Değirmendere, Aynalı, 1559 çeşidi, Papaz, Havran, Türbe çukuru, İstanbul çeşitleri aşılanmıştır. Aşılanan bitkiler iki büyüme sezonu boyunca gözlemlenmiş ve RT-PCR analizi yapılmıştır. Sakıt-2, Aynalı, Papaz aşı çeşitleri PPV enfekteli bulunurken Havran aşı çeşidinde symptom gözlenmemesine rağmen RT-PCR analizlerinde PPV pozitif bulunmuştur.

İnönü Üniversitesi Kayısı Araştırma Merkezi tarafından yeni kayısı çeşitleri geliştirilmesi amacıyla kapsamlı bir ıslah çalışması başlatılmıştır. “Çok Amaçlı Kayısı Islah Projesi” kapsamında; erken ve geç olgunlaşan yeni sofralık çeşitler, verim ve kurutma randımanı yüksek yeni kurutmalık çeşitleri ve Şarka hastalığına (PPV) dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi konusunda melezleme ıslah çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar kapsamında PPV’ye dayanıklı olduğu bilinen Stark Early Orange, Harcot, Goldrich ve Stella ile Hacıhaliloğlu, Şekerpere, Adilcevaz, Çöloğlu, Çataloğlu gibi yerel kayısı çeşitleri melezlenmiştir. Yapılan bu çalışmayla Malatya kayısılarının özelliklerini kaybetmeden Şarka hastalığına dayanıklılık özelliği kazandırmak hedeflenmiştir.

Şu ana kadar sadece ülkemizde varlığı bilinen PPV-T’nin doğal enfeksiyonuna karşı 6 farklı *Prunus* anacının hassaslığının değerlendirilmesi ile ilgili yapılan bir çalışma kapsamında, İzmir’de doğal olarak PPV-T enfekteli olan bir kayısı bahçesinde deneme kurulmuştur. Enfekteli kayısı bahçesine komşu olarak PPV’den arı olduğu bilinen sertifikalı *Prunus* anaçları (Myrobalan 29C, Garnem, GF 8.1, Nemaguard, Docera 6 ve GF677) dikilmiştir. Bu deneme bahçesinde PPV’nin yayılımı ve anaçlar üzerindeki başlıca yaprak biti türlerinin varlığı takip eden iki yıl (2010, 2011) süresince izlenmiştir. 2009 Nisan ayında, 2010 ve 2011 yıllarının Eylül aylarında deneme bahçesinden alınan örnekler DAS-ELISA ile analiz edilmiştir. 2010 yılında PPV enfeksiyonu Nemaguard’da %6 ve Myrobalan 29C’de %4 olarak belirlenmiştir. 2011 yılında enfeksiyon oranı Nemaguard için %16 ve Myrobalan 29C için %14 olarak artmıştır. Tüm bu testlerde diğer dört anaç PPV yönünden negatif sonuç vermiştir. Deneme alanından alınan dokuz viral izolatın PCR amplikonlarının sekans analizleri PPV-T ırkının AbTK izolatı ile %98 oranında, PPV-Rec ırkının Niksic6 ve BOR-3 izolatlarıyla %95 oranında, PPV-M ırkının N1, SK68 ve PS izolatlarıyla %94 oranında benzediğini göstermiştir. Deneme alanındaki enfekteli anaçlar ve doğal olarak enfektelenen kayısı ağaçlarından alınan örneklerin PPV karakterizasyonu yapılmış ve enfekteli ağaçlar %99.5 PPV-T olarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda Nemaguard ve Myrobalan 29C PPV-T ile doğal olarak enfektelenirken, *Prunus mariana* GF8.1, Docera6, GF677, ve Garnem PPV-T bakımından negatif bulunmuştur (Çağlayan ve ark., 2013).

Ulubaş Serçe ve ark. (2013b) bazı yerli Türk kayısı çeşitlerinde ve onların melezlerinde moleküler markörler aracılığıyla PPV dayanıklılığını araştırmışlardır. Çalışma kapsamında PGS1.21 ve PGS1.23 markörleri kullanılmış, Hacıhaliloğlu, Kabaası, Hasanbey, Çöloğlu, Adilcevaz5, Şekerpare, Mahmudun Eriği ve Çataloğlu gibi yerli kayısı çeşitlerini içeren toplam 180 kayısı progenisini taramışlardır. Markörlerle taranan yerli kayısı çeşitlerinden hiçbirinde PPV dayanıklılığını teşvik eden allele rastlanmadığı bildirilmiştir.

2.2. Dünya’da PPV’nin Varlığı, PPV’nin Biyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi ve PPV’ye Dayanıklılık ile İlgili Yapılan Çalışmalar

PPV ilk kez Bulgaristan’da 1915-1918 yıllarında erikte (Attanasof, 1932) tespit edilmiştir. Etmenin başlangıç noktası balkanlar iken 1940’lı yıllardan sonra kuzeyde Rusya, doğuda Türkiye ve Suriye, güneyde Yunanistan, İspanya ve batıda Portekiz’e kadar yayılmıştır (Sutic ve ark., 1999). Virüs ayrıca Şili (Roy ve Smith, 1994), Hindistan (Thakur ve ark., 1994) Kanada’da (Thompson ve ark. 2001), ABD’de (Levy ve ark., 2000) Japonya’da (Maejima ve ark., 2010) ve Rusya Federasyonu’nda (Prihodko ve ark., 2011) tespit edilmiştir.

PPV’nin, mekanik inokulasyon ve aşı ile taşındığı yapılan çalışmalarla ortaya konurken, *Prunus* konukçuları arasında temasla, polenle ve tohumla taşınmadığı belirtilmiştir (Garcia ve ark., 2014).

Hastalığın kısa mesafelere yayılması ise etkin olarak yaprak bitleri ile gerçekleşmektedir (Kegler ve Sutic, 1991).

Zeyen ve Berger (1990) tarafından ‘beslenme temelli taşınma’ olarak adlandırılan bir çalışmada, yaprak bitlerinin epidermal hücrelerde beslenmesi esnasında virüsü non-persistent olarak alabildiği ve aktarabildiği bildirilmiştir. Hastalığın, konukçu bitki üzerinde beslenmesi veya kolonize olması şart olmayan yaprak biti türleri tarafından da etkili bir şekilde taşınabildiği ifade edilmiştir. PPV gibi potyviruslerin vektör yaprak bitleri ile uzun mesafeler boyunca taşınmadığı genel olarak kabul edilse de spesifik çevre koşullarında bazı potyviruslerin göçmen yaprak bitleri ile uzun mesafeler boyunca taşınabileceğini düşündüren bazı kanıtların mevcut olduğu bildirilmiştir.

Shukla ve ark. (1994)'ün yapmış olduğu bir başka çalışmada PPV'nin yaprak bitleri ile bahçe içinde veya bahçeler arasında yayıldığı bildirilmiştir. PPV taşıyabilen vektörlerin ne kadar uzağa seyahat edebilecekleri ve enfekteli kaynaktan ne kadar süreyle PPV bulaştırabildikleri bilinmemektedir.

Avrupa'da PPV'nin birincil yaprak biti vektörleri Romanya'da (Isac ve ark., 1998), İşpanya'da (Llacer ve Cambra, 1998), Macaristan'da (Gaborjanyi ve Basky, 1995) ve Fransa'da (Labonne ve ark., 1995) tespit edilmiştir. Meyve bahçelerindeki vektör yaprak biti popölasyonları tür ve coğrafyaya göre farklılık göstererek farklı birincil vektörler ortaya çıkarabilir. Doğu Avrupa'da *H. pruni* ve *P. humuli*'nin önemli PPV vektörleri oldukları düşünölmektedir. Batı Avrupa'da ise *M. persicae* ve *A. spiraecola*, meyve bahçelerinde etkili PPV taşınması ile ilişkili olduğu bilinen daha yaygın vektör türleridir. Ayrıca, bir yaprak biti türünün popölasyonları arasındaki genetik farklılıklar potyvürüsleri taşıyabilme yetenekleri açısından değişiklik gösterebilir (Sohi ve Swenson, 1964; Singh ve ark., 1983; Lupoli ve ark., 1992).

Güney Fransa'da, *A. gossypii* (Glover)'ye ait bir popölasyon PPV'yi etkili bir şekilde taşımıştır; ancak Fransa'dan ve İşpanya'dan alınan başka popölasyonlar virüsü etkili bir şekilde taşıyamamıştır (Avinent ve ark., 1991; Labonne ve ark., 1995).

PPV'nin taşınmasında *Aphididae* familyasında yer alan *A. craccivora*, *A. spiraecola*, *B. helichrysi*, *B. cardui*, *M. persicae*, *M. varinas*, *M. humuli* yaprak biti türleri etkin bir şekilde rol almaktadır. Esas doğal vektörler *B. helichrysi*, *M. persicae* ve *M. humuli* 'dir. Virüs *A. alni*, *E. plebeja*, *H. pruni*, *L. corni*, *L. pratensis*, *M. laevis*, *M. ceraci*, *O. quinquecostatus*, *P. pilosus*, *T. rosae* ile taşınmamaktadır (Büchen-Osmond, 2006).

Labonne ve ark. (1995) tarafından yapılan bir çalışmada, PPV'nin potansiyel vektörü olan yaprak bitleri ile otsu konukılara ve *Prunus* türlerine taşınmasında kullanılan metodların etkinliği ve taşınma epidemiyolojisini araştırmışlardır. Bu alışma kapsamında kullanılan yaprak bitlerinden *Acyrtosiphon pisum* Harris bezelyede (*Pisum sativum* L.), *Aphis fabae* Scopoli yaygın baklagillerde (*Vicia faba* L.), *A. gossypii* Glover kabakta (*Cucurbita pepo* L.), *A. spiraecola* Patch, *M. euphorbiae* Thomas, *M. persicae* Sulzer patlıcanda (*Solanum melongena* L.), *D. noxia* Mordvirlko, *R. padi* L., *S. avenae* F. buğdayda çoğaltılmıştır. Çalışmada, "serbest beslenme yöntemi" ile kurulan

denemelerde virüs kaynağı olarak PPV (PPV V ve PPV BT izolatları) enfekteli bezelye (*Pisum sativum*) bitkileri, ‘kontrollü beslenme yöntemi’ (KBY) ile kurulan denemelerde de PPV enfekteli tütün (*N. benthamiana*) bitkileri kullanılmıştır. “Serbest beslenme yöntemi” (SBY) ile yaptıkları denemelerde PPV BT’yi daha iyi taşıdığı bilinen sağlıklı bitki olarak *P. Sativum* var. Colmo bezelyeleri kullanılmıştır. Bu yöntemde kendi konukçuları üzerinde binden fazla üretilmiş olan yaprak bitleri elek teliyle çevrelenmiş karanlık konteynırlara (15x40x10 cm) konulmuştur. Konteynır, 40 adet sağlıklı ve 8 adet PPV BT enfekteli bezelyelerin bulunduğu kafese (39x51x37 cm) konulmuştur. Yaprak bitlerinin serbest olarak 5 gün süresince konukçu bitkilerinden kafes içindeki diğer (sağlıklı ve enfekteli) bitkilerde beslenmesi sağlanmıştır. Yaprak bitleri, beş günlük periyottan sonra insektisit ile ilaçlanarak öldürülmüştür. Test bitkilerinin büyüme çemberinde (23 °C ± 1, 14 saat gün ışığı) 3 hafta simptomolojik gözleminden sonra immunolojik analizleri (Adamolle, 1993) yapılmıştır. Bu yönetime göre, *A. fabae*, *A. gossypii*, *A. spiraecola*, *M. persicae* ve *R. padi* yaprak bitlerinin PPV’yi etkin olarak taşıdığı bildirilmiştir. KBY ile yapılan denemelerde 100 adet kanatsız ergin ve nimflerden oluşan yaprak bitleri çoğaltıldıkları konukçuları üzerinden toplanmıştır. Bir saat aç bırakılan yaprak bitleri daha sonra PPV V ile enfekteli *N. benthamiana* üzerinde 6 dakika beslenmesi sağlanmış, sonra sağlıklı *N. benthamiana* bitkileri üzerine alınarak burada da 1 gece boyunca beslenmesi sağlanmıştır. Bir gece sağlıklı bitkide tutulan yaprak bitleri insektisitle ilaçlanarak bitkiler büyüme çemberine alınmıştır (23 °C ± 1, 14 saat gün ışığı). Bu yönetime göre *A. spiraecola* ve *M. persicae* yaprak bitlerinin PPV’yi etkin olarak taşıdığı bildirilmiştir. Prunus’dan Prunus’a gerçekleştirilen PPV taşıma denemelerinde yine SBY ve KBY kullanılmıştır. Enfeksiyon kaynağı olarak PPV BT ve PPV V izolatları ile enfekteli olan *P. persica* cv. GF305 bitkisi kullanılmıştır. İndikatör bitki olarak da sağlıklı GF305 bitkileri kullanılmıştır. Yapılan denemeler sonunda her iki PPV izolatı ile enfekteli bitkilerle ve her iki yöntemle kurulan denemelerde *H. pruni* ile PPV taşıması gerçekleştirilememiştir.

Kuzey Amerika’da doğal olarak bulunan 13 farklı yaprak biti türü ile PPV’nin Pennsylvania izolatlarının (PENN-3, PENN-4, PENN-7) deneysel taşınması denemeleri sonucunda *A. fabae*, *A. spiraecola*, *B. persicae*, *M. dirhodum*, *M. persicae*, *R. padi* ve *T. citricida*’nın virüsü taşımada başarılı olduğu, en etkili olanların *A. spiraecola* (%86) ve *M. persicae* (%83) türleri olarak tespit edildiği ve *A. pisum*, *Aphis glycines*, *A. solani*,

M. euphorbiae, *R. maidis* ve *S. avenae* türlerinin virüsü taşımada başarısız olduğu bildirilmiştir (Gildow ve ark., 2004).

PPV-Rec izolatlarının (BOR-3, BULG, Horomerice ve 143A) *M. persicae* ile taşınması etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada enfeksiyon kaynağı olarak PPV-Rec izolatları ile enfekteli *N. benthamiana* tütün bitkisi kullanılmıştır. Denemeler Labonne (1995) tarafından uygulanmış olan KBY'ye göre kurulmuştur. Denemelerde test bitkisi olarak *P. persica* cv. GF305 şeftali bitkisi, *Prunus armeniaca* cv. Manicot kayısı bitkisi ve *Prunus domestica* cv. Julior erik bitkileri kullanılmıştır. Çoğaltıldıkları konukçuları üzerinden toplanan 50 adet yaprak biti 3 saat aç bırakıldıktan sonra PPV enfekteli yaprak üzerinde 6 dakika beslenmiştir. Beslenme sonrası enfekteli bitkiden sağlıklı bitkiler üzerine alınan yaprak bitlerinin bir gece beslenmesi sağlanmış ve insektisitle ilaçlanarak öldürülmüştür. Test bitkileri 3 haftalık gözlem için uygun koşullara alınmış ve 3 hafta sonunda DAS-ELISA analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçlarına göre farklı izolatların farklı *Prunus* konukçularında birbirinden bağımsız taşınma oranları ortaya koyduğu tespit edilmiştir. BOR-3, BULG, Horomerice ve 143A izolatlarının *Prunus* konukçularına sırasıyla %35, %28, %80 ve %5 oranlarında *M. persicae* ile deneysel olarak taşınabildiği bildirilmiştir (Galasa ve ark., 2004).

Yunanistan'da yapışkan sürgün yöntemi ile gerçekleştirilen diğer bir çalışmada arazide kayısı ağaçlarında *A. gossypii* ve *H. pruni* en çok rastlanan yaprak biti türleri olmuş, PPV epidemiyolojisinde bu yaprak biti türlerinin rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (Varveri, 2006).

Manachini ve ark. (2007) tarafından gerçekleştirilen *M. persicae* ile PPV-M'nin otsu konukçulara taşınma çalışmasında enfeksiyon kaynağı olarak PPV-M enfekteli GF305 bitkisi kullanılmıştır. İndikatör bitki olarak da *Leguminosae* (*Pisum sativum* L., *Trifolium repens* L., *Trifolium pratense* L., ve *Lupinus polyphyllus* Lindley), *Caryophyllaceae* (*Saponaria ocymoides* L.), *Compositae* (*Zinnia elegans* L., *Taraxacum officinale* Weber, *Matricaria chamomilla* L., *Centaurea cyanus* L., *Achillea millefolium* L., ve *Bellis perennis* L.), *Amaranthaceae* (*Amaranthus retroflexus* L.), *Cruciferae* (*Lepidium sativum* L.), *Linaceae* (*Linum rubrum* L.) ve *Papaveraceae* (*Papaver rhoeas* L.) olmak üzere çimlenmeden sonra 3 haftalık büyüklükte olan toplam 15 tür otsu konukçu kullanılmıştır. Çoğaltıldığı konukçusu üzerinden tesadüfi olarak

toplanan kanatsız *M. persicae* yaprak bitleri, enfekteli GF305 bitkisi üzerine alınmış ve 30 dakika beslenmesi sağlanmıştır. Enfekteli bitkiden alınan yaprak bitleri (2- 6 adet) sağlıklı otsu indikatörler üzerine aktarılmıştır. Deneme sonunda yapılan RT- PCR analizleri sonrasında 15 adet otsu konukçu türünden 10 tanesine ait indikatörlerin PPV-M enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Otsu indikatör olarak kullanılan *P. sativum*, *M. chamomilla* ve *B. Perennis* türlerine ait test bitkilerinin taşıma denemesinde %100 oranında PPV-M ile bulaşık olduğu belirtilmiştir.

Wallis ve ark. (2007) PPV PENN3 ve PPV PENN4 izolatları ile enfekteli *P. persica* ‘GF-305’ bitkisini inokulum kaynağı olarak kullanmış ve *M. persicae* ile ‘Colmo’ bezelyelerine deneysel taşıma denemeleri yapmışlardır. Yaptıkları taşıma denemeleri sonucunda yaptıkları 80 adet ‘Colmo’ bezelye bitkisinden 3 tanesinin PPV ile enfektelendiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak inokulum kaynağı olarak *Prunus* bitkisi kullanılarak *M. persicae* ile otsu ‘Colmo’ bezelye bitkilerine sadece %3-5 oranlarında PPV taşındığını belirtmişlerdir.

Yine bir çalışmada Capote ve ark. (2009) toplam 405 adet *Prunus* (*Prunus salicina* Lindl.; *P. armeniaca* L.; *P. persicae* L. (Batsch); *P. dulcis* (Mill.) D.A. Webb.) bitkisine yaptıkları PPV tarama analizlerinde RNA izolasyonu yapmaksızın gerçekleştirdikleri spot real time RT-PCR ve RNA izolasyonu sonrasında yapılan real-time RT-PCR analizlerinin etkinliğini karşılaştırmışlardır. Yapılan çalışmalar sonucunda spot real-time RT-PCR’nin %93.6 oranında PPV’yi tespit hassasiyetine sahip olduğunu, çok fazla sayıda örnekle yapılan çalışmalarda bu yöntemin seri ve pratik olduğunu bildirmişlerdir.

Capote ve ark., (2010) tarafından gerçekleştirilen *M. persicae* ile PPV-M’nin deneysel taşınması çalışmasında, enfeksiyon kaynağı olarak PPV-M enfekteli GF305 anacı ve *P. persica* cv. Gladys’in genç fidanları kullanılmıştır. Çalışmada indikatör bitki olarak da sağlıklı GF305 ve GF677 üzerine aşılansın Calante, Mercil ve Royal Glory kültürvarları kullanılmıştır. Her bir enfeksiyon kaynağı için her bir indikatör bitki türünden 15’er adet bitki ile deneme kurulmuş, toplam 120 adet test bitkisi kullanılmıştır. Denemede, *M. persicae* yaprak bitlerinin kanatsız bireyleri toplanarak 1 saat aç bırakılmış, sonra 10 dakika enfekteli bitkide beslenmiş ve 25- 30’ar gruplar halinde her bir sağlıklı test bitkisi üzerine aktarılmıştır. Sağlıklı bitkide 2 saat beslenen

yaprak bitleri ilaçlanarak öldürülmüştür. Test bitkileri 8 hafta süresince simptomolojik olarak gözlenmiş ve bu süre sonunda PPV'nin universal tespit antiserumu olan 5B-IVIA (Cambra ve ark., 1994) ile DASI- ELISA analizleri yapılmıştır. Deneysel taşıma denemesinde, enfeksiyon kaynağı olarak kullanılan GF305'den, GF305 anacına ve Calante, Mercil ve Royal Glory kültüvarlarına sırasıyla %66.7 ve %46.7, %26.7 ve %26.7 oranlarında *M. persicae* ile PPV-M'nin taşındığı bildirilmiştir. Ayrıca enfeksiyon kaynağı olarak kullanılan Gladys kültüvarından sağlıklı cv. GF305'e %20.0, Mercil kültüvarına %13.3, Calante kültüvarına %26.7 ve Royal Glory kültüvarına da %0.0 oranlarında *M. persicae* ile PPV-M'nin taşındığı bildirilmiştir.

PPV, özellikle kayısı bitkisinde oldukça yıkıcı sonuçlara sebep olan bir hastalıktır. Bu nedenle hastalıkla mücadele açısından dünyada çeşitli dayanıklılık çalışmaları yapılmaktadır. Kayısı germplazmasında çeşitli dayanıklılık kaynakları tanımlanmıştır ve bunlar günümüzde hem hastalığın genetik kontrolünün anlaşılması hem de dayanıklı seleksiyonlarının üretilmesi amacıyla kullanılmaktadır. PPV dayanıklılıkla ilgili yapılan çalışmalarda tek bir genin (Dicenta ve ark. 2000), iki genin (Moustafa ve ark., 2001) veya üç genin (Guillet-Bellanger ve Audergon, 2001) PPV dayanıklılıktan sorumlu olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, şeftaliye benzeyen bir tür olan *P. davidiana*'da [*Prunus persica* (L.) Batsch.] poligenik dayanıklılık da tanımlanmıştır (Decroocq ve ark., 2005; Marandel ve ark., 2009b).

Soriano ve ark. (2008) daha ayrıntılı bir çalışmada 4 ayrı progenide (Goldrich'le 2 F1 soyu ve Lito ile 2 F2 soyu) dayanıklılık farklılıklarını analiz etmişlerdir. Bütün progenilerin tek bir dominant gen açısından beklenen orandan anlamlı bir şekilde farklılık gösterdiği (F1'de 1:1 ve F2'de 3:1) ve soyu üç-gen bazlı modele daha iyi bir şekilde uyan Goldrich x Canino melezi haricinde verilerin PPV dayanıklılığını kontrol eden 2 dominant bağımsız lokuslu digenik bir modele daha iyi bir şekilde uyduğu sonucuna varmışlardır.

Dondini ve ark. (2010) Lito ve Harcot kayısı çeşitlerinde *Plum pox virüs* M ve D ırklarına karşı dayanıklılık için QTL (Quantitative trait locus) tanımlanması çalışması yapmıştır. Bu çalışmada, üç yıllık fenotipik gözlemler sırasında fideler, semptomlara ve ELISA testlerine dayalı olarak dayanıklı, toleranslı ve duyarlı şeklinde üç sınıfa ayrılmıştır. Lito dayanıklı sınıfta yer alırken Harcot toleranslı olarak sınıflandırılmıştır.

PPV dayanıklılık kapsamında çalışılan yeni nesil haritalar, PPVres lokusunun daha iyi bir şekilde lokalize edilmesine izin veren ko-dominant basit sekans tekrarı (simple sequence repeat; SSR) markörleriyle oluşturulmuştur (Lambert ve ark., 2007; Soriano ve ark., 2008; Lalli ve ark., 2008; Marandel ve ark., 2009a; Pilarova ve ark., 2010; Dondini ve ark., 2010).

PPV dayanıklılık bölgesinin Vera Ruiz ve ark. (2011) tarafından bir dizi yapay bakteriyel kromozom (BAC; *bacterial artificial chromosome*) kökenli SSR ile daha ileri düzeyde satürasyonu PPVres lokusunun dayanıklı Lito ve Goldrich çeşitlerinin haritalarında sırasıyla 7.3 ve 5.9 cm'lik bölgelere daraltılmasıyla sonuçlanmıştır.

Soriano ve ark. (2012) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, kayısının PPVres bölgesinde toplam 42 SSR primer çifti düzenlenmiştir. Çalışmanın MAS (markör aracılığıyla seleksiyon; marker assisted selection) için standardize edilmesi amacıyla, haritalama için hem SEO hem de Goldrich kökenli melezlerde polimorfik olan sadece 7 SSR (PGS1.03, PGS1.20, PGS1.21, PGS1.23, PGS1.24, PGS1.252 ve 96P10_SP6) markörü seçilmiştir. Bir dizi dayanıklı ve duyarlı çeşit tarandıktan sonra bu SSR'lerin PPVres lokusu ile bağlantılı oldukları kanıtlanmıştır. Ayrıca yapılan bu çalışma ile markörlerin geliştirilmesi iki ayrı dayanıklılık kaynağına, Lito ve Goldrich'e ait haritalara dayalı olmakla beraber bunlarla ilişkili olan SEO, Pandora ve Sunglo gibi çeşitlerde PPV dayanıklılık allelleri saptamışlardır. Goldrich ve Lito ile ilişkili olmayan diğer dayanıklı çeşitlerde de aynı alleller tespit edilmiştir. Bu durum, geliştirilen SSR markörlerinin PPVres ile ilgili dayanıklılık geni bölgesinde olduğunu ve test edilen bütün dayanıklılık kaynaklarında ortak olduğunu düşündürebilir. Bu nedenle söz konusu markörlerin, bütün dayanıklı çeşitlerin döllerinde de MAS için uygun olabileceği bildirilmiştir.

Bugüne kadar *Prunus* türlerine özgü 360'ın üzerinde SSR geliştirilmiştir. Bunların birçoğu dayanıklılık genini bulmak için yapılan kayısı genetik haritalarında kullanılmıştır (Gürcan ve Yılmaz, 2012).

Balazs ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada 5 SSR markörü (Aprigms 18; Aprigms 24; ssrPACITA5; ssrPACITA17; EP5100) hassas ve dayanıklı kayısı çeşitlerini testlemede kullanmıştır. Kullanılan beş markörden üçünün (ssrPACITA5; ssrPACITA17; EP5100) PPV dayanıklı çeşitlerin seleksiyonu için uygun olduğu bildirilmiştir.

Bulgaristan'nın Plovdiv bölgesinde PPV enfeksiyonunun yoğun olarak bilindiği bir bahçeye 'Adesto 101' (*P.insititia*), 'Docera 6' (*P.domestica* x *P.cerasigera*), 'Garnem' (*P.dulcis* x *P.persica*), GreenPac ((*P.persica* x *P.davidiana*) x (*P.dulcis* x *P.persica*)), 'Nemaguard' (*Prunus persica* x *Prunus davidiana*), 'Mariana GF 8.1' (*P.cerasifera* x *P.munsoniana*) çeşitlerinin PPV'ye reaksiyonunu saptamak amacıyla bir deneme kurulmuştur. Üç vejetasyon süresi sonunda 5 kez ELISA testi yapılmış ve yapılan analizler sonucunda 'Nemaguard' %73, 'Mariana GF 8.1' %70.03, 'Adesoto' %54.43, 'GreenPac' %39.83, 'Garnem' % 39.03 ve hipersensitif olduğu bilinen birçok 'Docera 6' çeşidinde PPV enfeksiyonu saptandığı bildirilmiştir (Milusheva ve Bozhkova, 2013).

PPV'ye dayanıklılık ile ilgili birçok araştırma yapılmış ve bu güne kadar yapılan çalışmalarda Goldrich, Harcot, SEO, Lito, Harlayne, Stella, OrangeRed, NJA2 kayısı çeşitlerinin doğal olarak PPV dayanıklılık genini taşıdığını göstermiştir (Decroocq ve ark., 2013).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. ‘*Plum pox virus* (PPV) T Irkının Bazı Biyolojik Özelliklerinin Araştırılması’ Çalışmalarında Kullanılan Bitki ve Yaprak Biti Materyalleri

PPV-T ırkının bazı biyolojik özelliklerinin belirlenmesi için yaprak bitleri ile gerçekleştirilen, PPV-T’nin deneysel taşıma çalışmalarında sağlıklı indikatör bitki olarak tütün bitkisi (*Nicotiana benthamiana*), bezelye bitkisi (*Pisum sativum* ‘Colmo’ ve *Pisum sativum* ‘Siena’), hıyar bitkisi (*Cucumis sativus* L.) ve erik anacı (*Prunus cerasifera* cv. Myrobalan 29C) kullanılmıştır. Ayrıca, PPV-T’nin deneysel taşıma çalışmalarında inokulum kaynağı olarak, PPV-T Ankara izolatu (Ulubaş Serçe ve ark., 2009) ile enfekteli Myrobalan 29C erik anacı, İzmir Menemen civarında doğal PPV-T enfekteli olduğu bilinen kayısı ağacından (Çağlayan ve ark., 2013) alınan sürgün ve yaprak materyalleri ve PPV-T enfekteli kayısıdan (Menemen, İzmir) mekanik inokulasyonla enfektelenmiş *N. benthamiana* tütün bitkileri kullanılmıştır.

PPV-T’nin deneysel taşıma çalışmalarında kullanılan *Myzus persicae* yaprak bitleri saf kültür olarak otsu konukçusu olan patlıcan (*Solanum melongena* L.) bitkisi üzerinde ve *Aphis gossypii* yaprak bitleri ise saf kültür olarak otsu konukçusu olan patlıcan (*S. Melongena* L.) bitkisi ve hıyar (*C. Sativus* L.) bitkisi üzerinde çoğaltılmıştır. *Hyalopterus pruni* ise PPV’den ari olduğu bilinen erik ağaçları (*P.cerasifera* Ehrh.) üzerinden toplanarak doğrudan taşıma denemelerinde kullanılmıştır.

3.1.2. ‘Melez Kayısı Bitkilerinde PPV’ye Dayanıklılığın Moleküler Markörlerle Araştırılması’ Çalışmalarında Kullanılan Bitki Materyalleri

İnönü Üniversitesi Kayısı Araştırma Merkezi tarafından, PPV etmenine karşı dayanıklılık genleri taşıdığı bilinen Stark Early Orange (SEO) (Decroocq ve ark., 2013) ile ülkemizde özellikle Malatya yöresinde oldukça yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan Hacihaliloğlu, Adilcevaz5, Çöloğlu, Şekerpare ve Çataloğlu gibi yerli kayısı çeşitlerinin

melezlenmesi sağlanmıştır (Asma, 2000). Melezlemede ana ve babadan geçen genlerde farklılıkları gözden kaçırmamak amacıyla SEO ve yerli hatlar melezlenirken ebeveyn kombinasyonuna dikkat edilmiş ve yerli çeşitlerin hem ana hem baba olarak (örneğin Hacıhaliloğlu X SEO, SEO X Hacıhaliloğlu) melezlemeye katılması sağlanmıştır. SEO ve yerli kayısı çeşitlerinin melezlenmesiyle elde edilen yeni melezlerden de pomolojik özellikleri ve DNA kalitesi iyi olan bitkilerden alınan yaprak ve sürgünler “Melez kayısı bitkilerinde PPV’ye dayanıklılığın moleküler markörlerle araştırılması” çalışmasında bitki materyali olarak kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3. 1. SEO ile melezlenen yerli kayısıların (Hacıhaliloğlu, Adilcevaz5, Çöloğlu, Şekerpere ve Çataloğlu) ebeveyn kombinasyonları ve çalışmalarda kullanılan melez bitki sayıları

Sıra	Melez Çeşitler	Kullanılan Melez Sayısı
1	Hacıhaliloğlu x Stark Early Orange	11
2	Adilcevaz 5 x Stark Early Orange	14
3	Çöloğlu x Stark Early Orange	10
4	Şekerpere x Stark Early Orange	15
5	Stark Early Orange x Adilcevaz5	20
6	Stark Early Orange x Hacıhaliloğlu	9
7	Stark Early Orange x Şekerpere	22
8	Stark Early Orange x Çataloğlu	33
Toplam		134

3.2. Yöntem

3.2.1. 'Plum pox virus (PPV) T Irkının Bazı Biyolojik Özelliklerinin Araştırılması' Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler

3.2.1.1. Test Bitkilerinin Yetiştirilmesi ve Temini

PPV-T'nin yaprak bitleri ile deneysel taşıma denemelerinde kullanılan *N. benthamiana*, *P. sativum* 'Colmo', *P. sativum* 'Siena', *C. sativus* bitkilerinin tohumları 23 °C ± 1 sıcaklık ve 16 saat gün ışığı koşullarına sahip olan iklim odasında saksılara ekilmek suretiyle çimlendirilmiştir. Myrobalan 29C bitkileri ise Adana Toros Tarım Agripark Biyoteknoloji Merkezi'nde PPV'den ari olarak doku kültürü ile üretilmiş olan fidanlardan temin edilmiştir.

3.2.1.2. İnokulum Kaynağı Bitkilerin Elde Edilmesi

PPV-T'nin, aşı gözleri ile Myrobalan 29C erik anacı bitkilerine taşınması gerçekleştirilmiştir. Damsteegt ve ark. (2007)'e göre yapılan aşı ile PPV-T'nin taş çekirdekli meyve anaçlarına inokule edilmesinde, Ankara izolatu ile enfekteli olduğu bilinen kayısı bitkisinden alınan aşı gözleri, PPV-T'den ari olan Myrobalan 29C erik anaçları üzerine aşılanmıştır. Aşı ile PPV-T taşıma işlemi bitkilerde gözler uyanmadan önceki sezon olan Şubat- Mart aylarında gerçekleştirilmiştir. Aşılanan anaçların, tel ev içerisinde aşı gözlerinin sürmesi takip edilmiştir. Aşılamadan yaklaşık olarak 6- 8 hafta sonra Myrobalan 29C anaçlarındaki gözlerin sürmesi ve bitkilerin yapraklanması ile simptomolojik gözlemler gerçekleştirilmiştir. Daha sonra Myrobalan 29C bitkilerinden yaprak örnekleri alınarak yapılan DAS- ELISA ve real-time RT-PCR analizleri ile PPV-T'nin Myrobalan 29C bitkilerine taşınıp taşınmadığı belirlenmiştir. Tütün bitkilerine mekanik inokulasyon yöntemi ile PPV-T enfekte edilmesi çalışmaları Martinez- Gomez ve ark. (2000)'na göre gerçekleştirilmiştir. Mekanik inokulasyon işleminde enfeksiyon kaynağı olarak, İzmir Menemen civarında PPV-T ile doğal enfekteli olduğu bilinen kayısı ağaçlarından alınan yapraklar kullanılmıştır. PPV-T simptomunu yoğun olarak içeren 6-8 kayısı yaprağı üzerine 25 ml 0.01 M PBS (pH 7) eklenmiş ve bir havan

içerisinde havaneli yardımıyla iyice ezilerek virüs içeren yaprak ekstraktı elde edilmiştir. 10 adet *N. benthamiana* tütün bitkisinin yaprak yüzeyine hafif karborandum (zımpara) tozu uygulanmıştır. Her bitkinin yaralanan yapraklarına 500 µl virüs içeren yaprak ekstraktı sürüldükten sonra 2-3 dakika beklenmiş ve daha sonra yapraklar saf su ile dikkatlice yıkanmıştır. Mekanik inokulasyon işlemi tamamlanan bitkiler, 23 °C sıcaklık ve 16 saat gün ışığı olan iklim odasında simptomolojik gözleme alınmıştır. Yaklaşık olarak 4- 6 hafta sonunda da tütün bitkilerine yapılan DAS-ELISA ve real-time RT-PCR analizleri ile PPV-T enfekteli tütün bitkileri belirlenmiştir.

PPV-T ile enfekteli olduğu gerek simptomolojik gözlemler gerekse de yapılan DAS- ELISA ve real-time RT- PCR analizleri ile saptanan tütün bitkileri, Myrobalan 29C bitkileri ve İzmir Menemen civarında doğal olarak PPV-T enfekteli olduğu bilinen kayısı bahçesinden Mart- Nisan aylarında alınan yaprak ve sürgünler, PPV-T'nin yaprak bitleri ile deneysel taşınması denemelerinde inokulum kaynağı olarak kullanılmıştır.

3.2.1.3. Yaprak Bitlerinin Temini ve Çoğaltılması

M. persicae ve *A. gossypii* Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nden Doç. Dr. Serdar SATAR, Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Koruma Bölümünden Prof. Dr. Gülşen SERTKAYA ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü'nden temin edilmiştir.

M. persicae, PPV'den ari olduğu bilinen ve tohumdan yetiştirilen patlıcan (*S. melongena*) bitkisi üzerinde (Şekil 3. 1), *A. gossypii* de PPV'den ari olduğu bilinen ve tohumdan yetiştirilen patlıcan (*S. melongena*) bitkisi ve hıyar (*C. sativus*) bitkisi üzerinde (Şekil 3. 2) 24 °C sıcaklık ve 15 saat gün ışığı ve %70 nem koşullarına sahip olan iklim kabininde saf kültür olarak üretilmiştir.

H. pruni'nin ana konukçusu *Prunus* türleridir. Bu yaprak bitinin ikincil konukçu genellikle şeytan mumu (*Typha latifolia* L.) ve kamış (*Phragmites australis* Cavanilles) bitkileri olduğundan laboratuvar koşullarında üretimi oldukça zordur (Latham ve Milles, 2011). Bu nedenle *H. pruni* yaprak bitleri, Mustafa Kemal Üniversitesi'nde bulunan ve PPV'den ari olduğu tespit edilen erik ağaçları üzerinden popülasyonlarının en yoğun olduğu Mart- Nisan aylarında doğrudan alınmıştır.



Şekil 3. 1. Patlıcan bitkisi üzerinde saf kültür olarak çoğaltılan *Myzus persicae* yaprak bitleri



Şekil 3. 2. Patlıcan bitkisi üzerinde (solda) ve hıyar bitkisi üzerinde (sağda) saf kültür olarak çoğaltılan *Aphis gossypii* yaprak bitleri

3.2.1.4. PPV-T'nin Yaprak Bitleri ile Deneysel Taşıma Denemeleri

PPV-T ırkının yaprak bitleri ile taşınma olanaklarının araştırılması çalışması, Labonne ve ark. (1995)'a göre KBY ve SBY olmak üzere iki farklı yöntemde küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.4.1. 'Kontrollü Beslenme Yöntemi' (KBY) ile Deneysel Taşıma Denemeleri

3.2.1.4.1.1. *Myzus persicae* ile Bezelye (*Pisum sativum* 'Colmo'; *Pisum sativum* 'Siena') Bitkisine Deneysel Taşıma Denemeleri

M. persicae ile deneysel taşıma denemelerinde indikatör bitki olarak ticari bir çeşit olmayan ve PPV'ye hasas olduğu bilinen *P. sativum* 'Colmo' bezelyeleri (Wallis ve ark., 2007) ile ülkemize ithalatı yoğun olarak yapılan (İzmir Zirai Karantina Müdürlüğü ithalat verileri) ancak PPV'ye hassasiyeti konusunda henüz bir çalışma yapılmamış olan *P. sativum* 'Siena' bezelye bitkileri kullanılmıştır (Şekil 3. 3). Bezelye bitkileri, tohumun çimlenmesinden 7 gün sonrasında, 3-5 yapraklı döneminde deneysel taşıma denemelerine alınmıştır. 60 adet 'Colmo' ve 20 adet 'Siena' bezelyeleri kullanarak farklı zamanlarda dört deneysel taşıma denemesi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca indikatör bezelye bitkilerinin simptomolojik gelişiminin gözlemlendiği iklim odasına, ortamda oluşabilecek viral bulaşmaları kontrol ve tespit amacıyla PPV-T'den ari olan 10 adet 'Colmo' bezelye bitkisi konulmuştur. Taşıma denemelerinde inokulum kaynağı olarak PPV-T Anakara izolatu ile enfekteli Myrobalan 29C bitkisi kullanılmıştır.

Taşıma denemeleri aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. Denemede kullanılan sağlıklı bezelye bitkileri, üzerlerine tek tek tabanları kesilmiş falkon tüpler geçirilerek taşıma denemelerine hazırlanmıştır (Şekil 3. 4).
2. Denemede kullanılan çok sayıda kanatsız form yaprak biti, saf kültür olarak çoğaltıldığı patlıcan bitkisi üzerinden fırça ve emgi tüpü yardımı ile petri kabı içerisine toplanarak 60-75 dakika beyaz ışık altında aç bırakılmıştır (Şekil 3. 5).



Şekil 3. 3. *Myzus persicae* ile taşıma denemelerinde kullanılan *Pisum sativum* 'Colmo' (solda) ve *P. sativum* 'Siena' bitkileri (sağda)

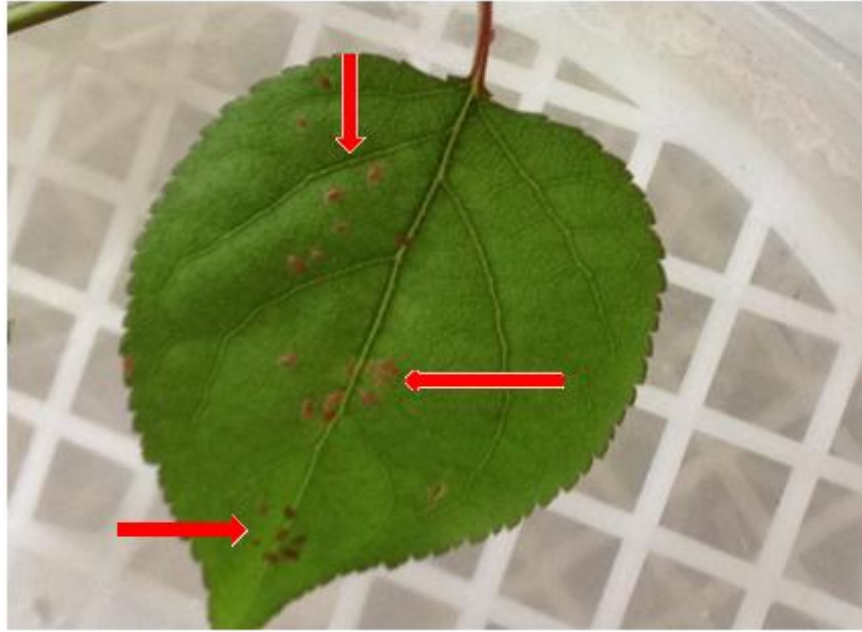


Şekil 3. 4. Bezelye bitkilerinin üzerine tabanı kesilmiş falkon tüp geçirilerek *Myzus persicae* ile PPV-T deneysel taşıma denemelerine hazırlanması

3. Petri içerisinden alınan 30-35 adet yaprak biti PPV-T ile enfekteli Myrobalan yaprağı üzerinde 3- 5 dakika beslenmesi sağlanmıştır (Şekil 3. 6).



Şekil 3. 5. *Myzus persicae* yaprak bitlerinin, çoğaltıldığı patlıcan bitkisi üzerinden emgi tüpü yardımı ile toplanması (solda) ve petri içerisine konulması (sağda)



Şekil 3. 6. *Myzus persicae* yaprak bitlerinin PPV-T Ankara izolatu ile enfekteli Myrobalan 29C yaprağı üzerinde beslenmesi

4. Enfekteli Myrobalan 29C yaprağı üzerinde beslenen yaprak bitleri tekrar emgi tüpü ile enfekteli yaprak üzerinden toplanmış ve her bir sağlıklı bitki üzerinde 30-35 yaprak biti olacak şekilde indikatörbezelye bitkisine aktarılmıştır. (Şekil 3. 7).



Şekil 3. 7. PPV-T enfekteli yapraktan emgi tüpü ile toplanan *Myzus persicae* yaprak bitlerinin indikatör bezelye bitkisi üzerine aktarılması

5. Yaprak bitleri indikatör bezelyeye aktarıldıktan sonra falkon tüplerin kapakları kapatılmış ve yaprak bitlerinin tüm gece indikatör bezelye bitkisi üzerinde beslenmesi sağlanmıştır.
6. Beslenme sonunda yaprak bitleri insektisitle ilaçlanarak öldürülmüştür.
7. İlaçlama sonrasında bezelye bitkileri $23^{\circ}\text{C} \pm 1$ sıcaklık; 16 saat ışık olanaklarına sahip olan iklim odasına alınmış, burada simptomatolojik olarak taşıma denemesinin takibi 4- 6 hafta süresince gerçekleştirilmiştir.
8. Bu süre sonunda bitkilerden yaprak örnekleri alınarak DAS-ELISA real-time RT- PCR analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.4.1.2. *Myzus persicae* ile Tütün (*Nicotiana benthamiana*) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemeleri

M. persicae ile gerçekleştirilen deneysel taşıma denemelerinde indikatör bitki olarak tütün (*N. benthamiana*) bitkileri kullanılmıştır. Tütün bitkileri çimlenmelerini takiben 3-5 yapraklı dönemdeyken deneysel taşıma denemelerine alınmıştır. Tütün

bitkisine yapılan deneysel taşıma denemelerinde üç farklı inokulum kaynağı (PPV-T doğal enfekteli kayısı, PPV-T Ankara izolatu ile enfekteli Myrobalan 29C, mekanik inokulasyonla PPV-T enfektelenmiş tütün) ile üç farklı zamanda taşıma denemeleri gerçekleştirilmiştir.

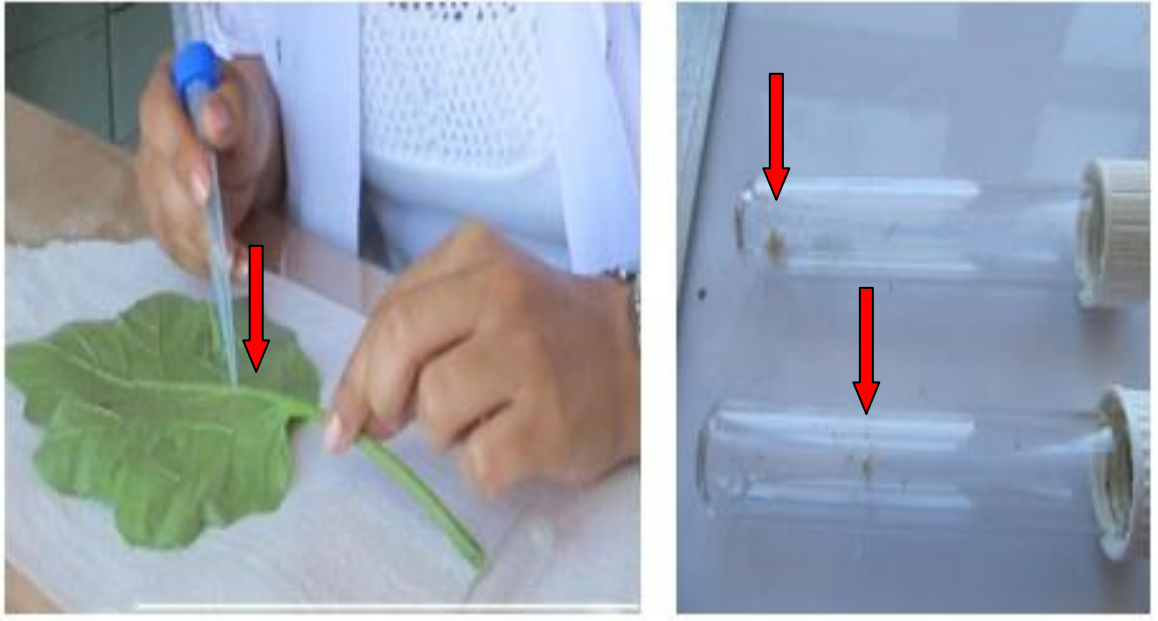
İnokulum kaynağı olarak İzmir Menemen civarında PPV-T doğal enfekteli olduğu bilinen kayısı ağacından alınan yaprak ve sürgünlerin kullanılmasıyla yapılan denemelerde, indikatör olarak 60 adet sağlıklı tütün bitkisi kullanılmıştır.

Deneysel taşıma denemesi aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. 3-5 yapraklı döneme gelen tütün bitkileri üzerine tabanı kesik falkon tüpler geçirilerek bitkiler denemeye hazırlanmıştır (Şekil 3. 8).
2. Kanatsız formda olan yaprak bitleri, saf kültür olarak çoğaltıldıkları patlıcan bitkisi üzerinden fırça ve emgi tüpü yardımı ile toplanmış ve cam tüplere alınarak beyaz ışık üzerinde 30 dakika aç bırakılmıştır (Şekil 3. 9).

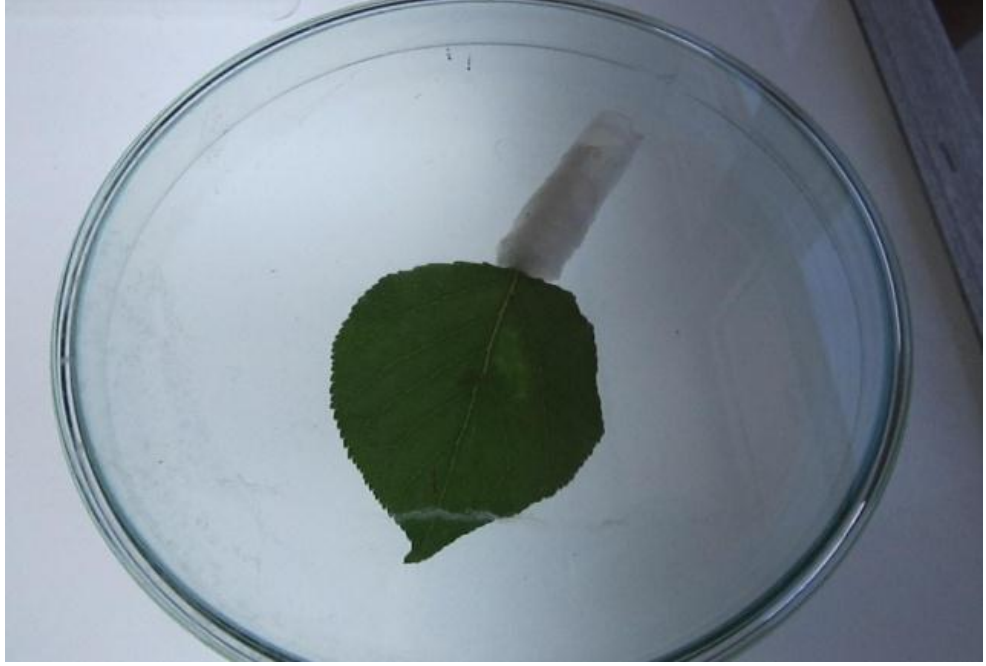


Şekil 3. 8. Sağlıklı tütün (*Nicotiana benthamiana*) bitkilerine tabanı kesik falkon tüp geçirilerek deneysel taşıma denemesine hazırlanması



Şekil 3. 9. Patlıcan bitkisi üzerinden emgi tüpü yardımı ile toplanan *Myzus persicae* yaprak bitlerinin (solda) kapaklı cam tüplere alınması ve beyaz ışık üzerinde bekletilmesi (sağda)

3. Enfekteli kayısı sürgününden üç adet yaprak alınmıştır ve bu yaprakların deneme süresince canlılığını korumak amacıyla yaprak sapları saf su içeren ependorf tüpler içine yerleştirilmiştir. Yapraklar petrilerin içerisine konmuştur. Yarım saat sonunda tüplerden alınan yaprak bitleri, PPV-T ile enfekteli yapraklar üzerine aktarılmıştır ve 5- 6 dakika beslenmesi sağlanmıştır. Yaprak bitlerinin beslenme süreleri boyunca petriler beyaz ışık üzerinde bekletilmiştir (Şekil 3. 10).
4. Enfekteli kayısı yaprağında beslenmesi tamamlanan 30- 35 adet yaprak biti, tütün bitkisine aktarılacak üzere enfekteli kayısı yaprağı üzerinden emgi tüpü yardımı ile toplanmıştır (Şekil 3. 11).

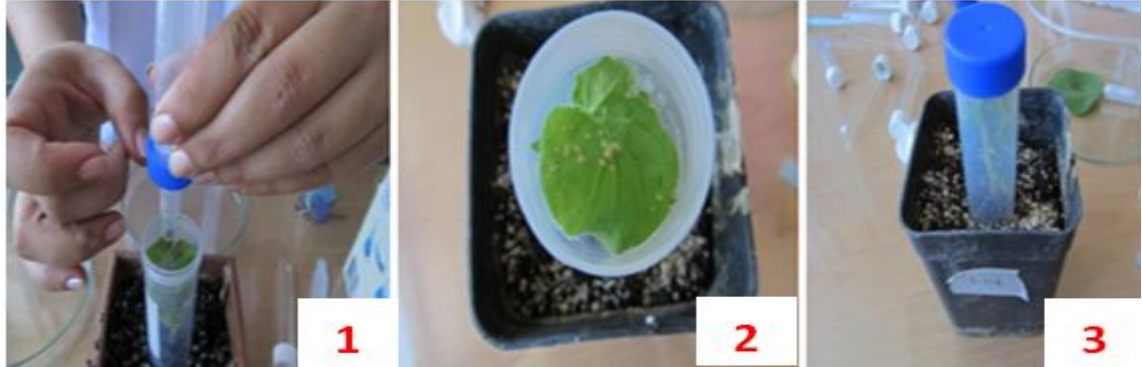


Şekil 3. 10. Beyaz ışık üzerine alınan ve canlı kalması için yaprak sapı saf su dolu ependorf tüp içine batırılmış olan PPV-T enfekteli kayısı yaprağı üzerinde, *Myzus persicae* yaprak bitlerinin beslenmesinin sağlanması

5. Yaprak bitleri (30- 35 yaprak biti/ bitki), emgi tüpü ile sağlıklı tütün bitkileri üzerine aktarılmış ve falkon tüplerin kapakları kapatılarak burada tüm gece beslenmeleri sağlanmıştır (Şekil 3. 12).
6. Tütün bitkisi üzerinde beslenmesi tamamlanan yaprak bitleri ertesi gün insektisitle ilaçlanarak öldürülmüştür.
7. İndikatör tütün bitkileri 4- 6 hafta süresince simptomatolojik gözlem amacıyla iklim odasına alınmıştır. Bu süre sonunda PPV varlığını tespit etmek amacıyla tütün bitkilerinden yaprak örnekleri alınarak DAS-ELISA ve real-time RT- PCR analizleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. 11. *Myzus persicae* yaprak bitlerinin PPV-T enfekteli kayısı yaprağı üzerinden emgi tüpü ile toplanması



Şekil 3. 12. *Myzus persicae*'nin enfekteli kayısı yaprağında beslendikten sonra sağlıklı tütün bitkisi üzerine aktarılması (1), *Myzus persicae* yaprak bitlerinin sağlıklı tütün bitkisi üzerinde beslenmesi (2), yaprak bitlerinin tütün bitkisine aktarıldıktan sonra falkon tüpün kapağının kapatılması (3)

İnokulum kaynağı olarak PPV-T Ankara izolatu ile enfektelenmiş Myrobalan 29C bitkisi ve mekanik inokulasyonla PPV-T enfektelenmiş tütün bitkisi kullanılmasıyla yapılan denemelerde, 10'ar adet sağlıklı tütün bitkisi kullanılmıştır. Her

iki inokulum kaynağı ile farklı zamanlarda kurulan deneysel taşıma denemesi aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. 3- 5 yapraklı dönemde olan sağlıklı tütün bitkileri üzerlerine falkon tüpler geçirilerek deneysel taşıma denemesine hazırlanmıştır.
2. Saf kültür olarak patlıcan bitkisinde çoğaltılan ve denemede kullanılan kanatsız formda olan yaprak bitleri fırça ve emgi tüpü ile petri kabı içerisine toplanarak beyaz ışık altında 60- 75 dakika aç bırakılmıştır.
3. Petri içerisinden alınan 30- 35 adet yaprak biti 6- 10 dakika beslenmesi amacıyla PPV-T enfekteli Myrobalan 29C (Şekil 3.13) ve tütün (Şekil 3. 14) bitkilerinin yaprağı üzerine aktarılmıştır.



Şekil 3. 13. PPV-T enfekteli Myrobalan 29C yaprağı üzerinde *Myzus persicae* yaprak bitlerinin beslenmesi



Şekil 3. 14. PPV-T enfekteli tütün yaprağı üzerinde *Myzus persicae* yaprak bitlerinin beslenmesi

4. PPV-T enfekteli Myrobalan 29C bitkisi ve tütün bitkisinde beslenmesini tamamlayan yaprak bitleri emgi tüpü ile toplanmıştır. *M. persicae* yaprak bitleri her bir bitki üzerinde 30- 35 adet olacak şekilde sağlıklı tütün bitkisine aktarılmış ve burada tüm gece beslenmesi sağlanmıştır (Şekil 3. 15).

5. Ertesi gün sağlıklı tütün bitkisinde beslenmesi tamamlanan yaprak bitleri insektisit (Eforia 247 SC: 141 g/l thiamethoxam; 106 g/l lambda-cyhalothrin) ilaçlanarak öldürülmüştür.

6. İndikatör tütün bitkileri 4- 6 hafta süresince simptomatolojik gözlem amacıyla iklim odasına alınmıştır. Bu süre sonunda, PPV varlığını tespit etmek amacıyla tütün bitkilerinden yaprak örnekleri alınarak DAS- ELISA ve real-time RT- PCR analizleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. 15. Sağlıklı tütün bitkisinde beslenen *Myzus persicae* yaprak bitleri

3.2.1.4.1.3. *Aphis gossypii* ile Bezelye (*Pisum sativum* ‘Colmo’; *Pisum sativum* ‘Siena’) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemeleri

A. gossypii ile deneysel taşıma denemelerinde indikatör bitki olarak ticari bir çeşit olmayan ve PPV’ye hasas olduğu bilinen *P. sativum* ‘Colmo’ bezelyeleri (Wallis ve ark., 2007) ile ülkemize ithalatı yoğun olarak yapılan (İzmir Zirai Karantina Müdürlüğü ithalat verileri) ancak PPV’ye hassasiyeti konusunda henüz bir çalışma yapılmamış olan *P. sativum* ‘Siena’ bezelye bitkileri kullanılmıştır. Bezelye bitkileri, tohumun çimlenmesinden 7 gün sonrasında, 3- 5 yapraklı döneminde deneysel taşıma denemelerine alınmıştır. 30 adet ‘Colmo’ ve 20 adet ‘Siena’ bezelye bitkisi kullanılarak iki farklı zamanda deneysel taşıma denemeleri kurulmuştur. *A. gossypii* ile farklı zamanlarda yapılan deneysel taşıma denelerinde inokulum kaynağı olarak PPV-T enfekteli Myrobalan 29C bitkisi kullanılmıştır. Deneysel taşıma denemeleri aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir.

1. Taşıma denemesinde kullanılan bezelye bitkileri üzerine falkon tüpler geçirilmiş ve bitkiler taşıma denemesine hazırlanmıştır.
2. Saf kültür olarak patlıcan ve hıyar bitkisinde çoğaltılan yaprak bitlerinden kanatsız formda olanlar fırça ve emgi tüpü yardımı ile toplanarak petri kabı içerisine konulmuş ve 60- 75 dakika beyaz ışık altında aç bırakılmıştır (Şekil 3. 16).



Şekil 3. 16. Çoğaltıldığı hıyar bitkisi yaprağı üzerinden emgi tüpü ile toplanan *Aphis gossypii* yaprak bitlerinin (1) petri içerisinde toplanması (2)

3. Petri içerisinden alınan 30- 35 adet yaprak biti PPV-T enfekteli Myrobalan 29C yaprağı üzerinde 6- 10 dakika beslendikten sonra emgi tüpü ile toplanmıştır. *A. gossypii* yaprak bitleri her bir bitki üzerinde 30- 35 adet olacak şekilde sağlıklı bezelye bitkisine (30- 35 yaprak biti/ bitki) aktarılmıştır (Şekil 3. 17).
4. Tüm gece indikatör bezelye bitkisinde beslenen yaprak bitleri insektisitle ilaçlanarak öldürülmüştür.
5. İlaçlama sonrasında bezelye bitkileri iklim odasına alınmış, burada simptomatolojik olarak taşıma denemesi 4- 6 hafta süresince takip edilmiştir. Bu süre sonunda PPV'nin varlığını tespit etmek amacıyla bezelye bitkilerinden yaprak örnekleri alınarak DAS-ELISA ve real-time RT- PCR analizleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. 17. *Aphis gossypii* yaprak bitlerinin PPV-T enfekteli Myrobalan 29C bitkisi üzerinde (solda) ve sağlıklı bezelye bitkisi üzerinde (sağda) beslenmesi

3.2.1.4.1.4. *Aphis gossypii* ile Tütün (*Nicotiana Benthiana*) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemeleri

A. gossypii ile farklı zamanlarda yapılan iki taşıma denemesinde indikatör bitki olarak 20 adet *N. benthamiana* tütün bitkisi kullanılmıştır. Taşıma denemelerinde PPV-T inokulum kaynağı olarak mekanik inokulasyonla PPV-T enfektelenmiş tütün bitkisi kullanılmıştır. Denemelerde kullanılan yaprak bitleri saf kültür olarak hıyar bitkisinde çoğaltılmıştır. Kanatsız form yaprak bitleri fırça ve emgi tüpü yardımı ile çoğaltıldığı hıyar bitkisi üzerinden toplanarak petri kabı içerisine alınmış ve 60- 75 dakika beyaz ışık altında aç bırakılmıştır (Şekil 3. 18). Petri içerisinden alınan 30- 35 adet yaprak biti PPV-T ile enfekteli tütün yaprağı üzerinde 6- 10 dakika beslendikten sonra emgi tüpü ile toplanmıştır. *M. persicae* yaprak bitleri her bir bitki üzerinde 30- 35 adet olacak şekilde sağlıklı tütün bitkisine aktarılmıştır (Şekil 3. 19). Tül kafes içine alınan indikatör tütün bitkilerinde tüm gece beslenmesi sağlanan yaprak bitleri ertesi gün insektisitle ilaçlanarak öldürülmüştür. İlaçlama sonrasında tütün bitkileri iklim odasına alınmıştır. Taşıma denemesi simptomatolojik olarak 4- 6 hafta süresince takip edilmiştir. Bu süre

sonunda tütün bitkilerinden yaprak örnekleri alınarak DAS- ELISA ve real-time RT-PCR analizleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. 18. Hıyar bitkisi üzerinden emgi tüpü ile toplanan *Aphis gossypii* yaprak bitlerinin (solda) petri kabı içerisine alınması (sağda)



Şekil 3. 19. *Aphis gossypii* yaprak bitlerinin PPV-T enfekteli tütün bitkisi üzerinde (1) ve sağlıklı indikatör tütün bitkisi üzerinde (2) beslenmesi

3.2.1.4.1.5. *Aphis gossypii* ile Hıyar (*Cucumis sativus*) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemeleri

A. gossypii ile hıyar bitkisine deneysel taşıma denemelerinde indikatör bitki olarak 20 adet hıyar (*C. sativus*) bitkisi kullanılmıştır. Hıyar bitkileri çimlenmeyi takiben 3- 4 yapraklı döneme gelince denemelere dahil edilmiştir. Denemelerde inokulum kaynağı olarak da PPV-T enfekteli tütün bitkisi kullanılmıştır. Denemede kullanılan kanatsız form *A. gossypii* yaprak bitleri saf kültür olarak hıyar bitkisinde çoğaltılmıştır.

Yaprak bitleri fırça ve emgi tüpü ile çoğaltıldığı hıyar bitkisi üzerinden petri kabı içerisine toplanarak 60- 75 dakika beyaz ışık altında aç bırakılmıştır. Petri içerisinden alınan 30- 35 adet yaprak biti PPV-T ile enfekteli tütün yaprağı üzerinde 6- 10 dakika beslendikten sonra emgi tüpü ile toplanmıştır. *A. gossypii* yaprak bitleri her bir bitki üzerinde 30- 35 adet olacak şekilde sağlıklı hıyar bitkisine aktarılmıştır (Şekil 3. 20). Hıyar bitkileri tül kafes içerisine konulmuş ve yaprak bitlerinin tüm gece beslenmesi sağlanmıştır. Tüm gece sağlıklı hıyar bitkisinde beslenen yaprak bitleri ertesi gün insektisitle ilaçlanarak öldürülmüştür.

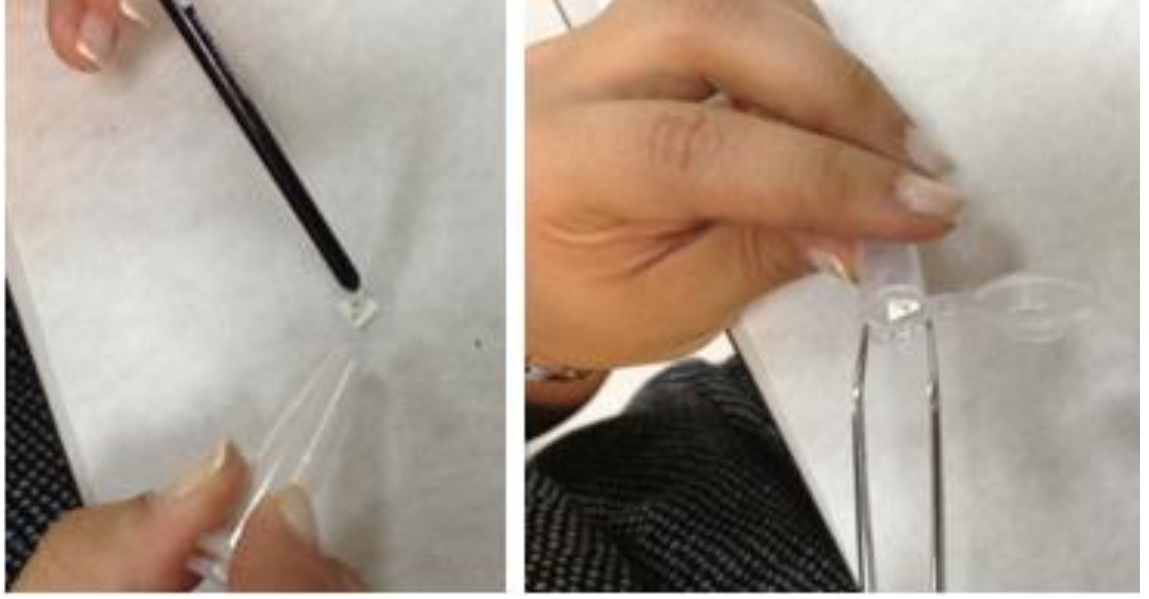


Şekil 3. 20. Sağlıklı hıyar bitkisi üzerine aktarılmış olan *Aphis gossypii* yaprak bitleri

İlaçlama sonrasında hıyar bitkileri iklim odasına alınmıştır. Taşıma denemesinin simptomatolojik olarak takibi 4- 6 hafta süresince gerçekleştirilmiştir. Bu süre sonunda hıyar bitkilerinden yaprak örnekleri alınarak DAS- ELISA ve real-time RT-PCR analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.4.1.6. *Hyalopterus pruni* ile Myrobalan 29C (*Prunus cerasifera*) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemeleri

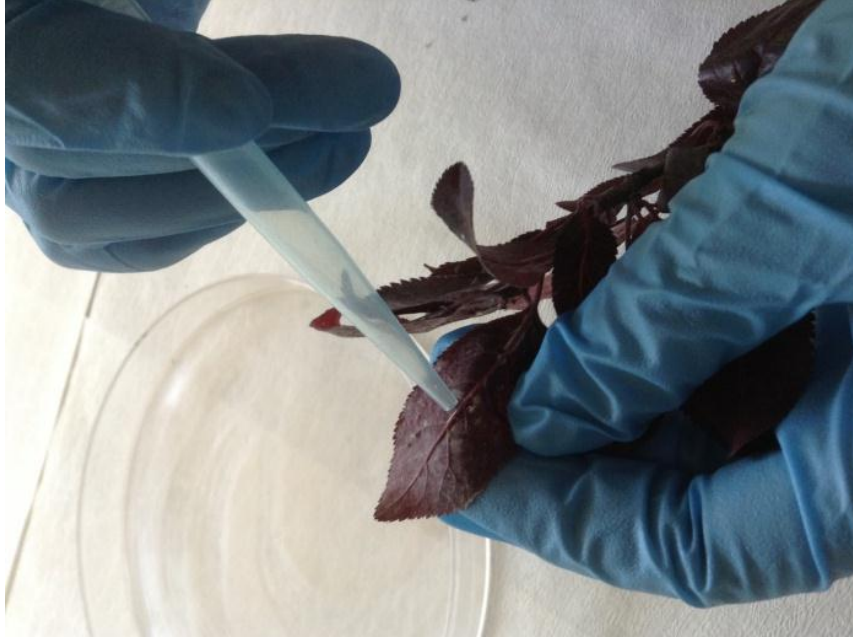
Bu taşıma denemesinde sağlıklı indikatör bitki olarak, Adana Toros Tarım Agripark Biyoteknoloji Merkezi'nin doku kültüründe PPV'den ari olarak ürettiği Myrobalan 29C bitkileri kullanılmıştır. Denemede toplam 6 adet indikatör bitki kullanılmıştır. *H. pruni* yaprak bitleri PPV-T'den ari olduğu bilinen erik ağaçlarından doğrudan toplanmıştır. Denemede inokulum kaynağı olarak PPV-T enfekteli Myrobalan 29C bitkisi kullanılmıştır. Deneme kurulmadan önce erik bitkisinin yapraklarından rasgele toplanan 20 adet yaprak biti tek tek naylon membran (3MM Whatman) üzerine bir ependorf tüpün tabanıyla ezilmiş ve pens yardımı ile ependorf tüplere alınmıştır (Şekil 3. 21). Membran üzerine ezilen yaprak bitlerinin PPV'den ari olup olmadığını tespit etmek için daha sonra spot real-time RT- PCR analizi yapılmıştır.



Şekil 3. 21. *Hyalopterus pruni* yaprak bitlerinin ependorf tüpün tabanıyla membran (3 MM Whatman) üzerine ezilerek (solda) pesn yardımı ile ependorf tüp içerisine alınması (sağda)

H. pruni yaprak biti ile deneysel taşıma denemeleri, aşağıda anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.

1. Erik ağacının yaprak ve sürgünlerinden fırça ve emgi tüpü yardımı ile petri kabına toplanan kanatsız form yaprak bitleri 60- 75 dakika beyaz ışık altında aç bırakılmıştır (Şekil 3. 22).
2. Aç bırakılan yaprak bitlerinden 30- 35 adet toplanarak, PPV-T ile enfekteli Myrobalan 29C bitkisi üzerinde 6- 10 dakika beslenmesi sağlanmıştır (Şekil 3. 23).
3. Daha sonra yaprak bitleri her bir sağlıklı Myrobalan 29C bitkisi üzerindeki 3 farklı yaprağa aktarılmıştır ve beslenmenin gerçekleştiği her yaprak beyaz bir iplikle işaretlenmiştir (Şekil 3. 24). Her bir sağlıklı Myrobalan 29C bitkisine, 3 farklı yaprakta toplam 90- 105 adet yaprak biti verilmiştir.
4. Yaprak bitlerinin indikatör Myrobalan 29C bitkisinde tüm gece beslenmeleri sağlanmıştır. Ertesi gün yaprak bitleri insektisitle ilaçlanarak öldürülmüştür.



Şekil 3. 22. *Hyalopterus pruni* yaprak bitlerinin erik yapraklarından emgi tüpü yardımı ile toplanarak petri kapları içerisine alınması



Şekil 3. 23. *Hyalopterus pruni* yaprak bitlerinin PPV-T enfekteli Myrobalan 29C bitkisi üzerinde beslenmesi



Şekil 3. 24. PPV-T enfekteli yaprak üzerinden emgi tüpü yardımı ile toplanmış olan *Hyalopterus pruni* yaprak bitlerinin sağlıklı Myrobalan 29C bitkisine aktarılması (solda) ve yaprak biti aktarılan yaprakların beyaz iplikle işaretlenmesi

Myrobalan 29C bitkileri 8- 12 hafta simptomatolojik gözlem için iklim odasına alınmıştır. 12 hafta sonunda bitkilere real-time RT- PCR analizi yapılmış ve soğuklama ihtiyaçlarını sağlamak amacıyla, düşük ışık içeren ve + 4 °C sıcaklıkta olan bir ortama alınmıştır (Damsteegt ve ark., 2007). Myrobalan 29C bitkileri 2- 3 aylık soğuklama periyodu sonunda 23 °C sıcaklığa sahip iklim odasına alınarak sürgün vermesi sağlanmış ve yapraklarda simptomolojik gözleme devam edilmiştir.

3.2.1.4.2. ‘Serbest Beslenme Yöntemi’ (SBY) ile Deneysel Taşıma Denemeleri

3.2.1.4.2.1. *Myzus persicae* ile Tütün (*Nicotiana benthamiana*) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemeleri

PPV-T’nin, *M. persicae* ile *N. benthamiana* tütün bitkisine deneysel taşıma denemelerinde iki farklı SBY metodu kullanılmıştır.

İlk taşıma denemesinde indikatör bitki olarak 7 adet *N. benthamiana* tütün bitkisi kullanılmıştır. Denemede inokulum kaynağı olarak İzmir Menemen civarında doğal olarak PPV-T enfekteli bulunan kayısı ağacından alınan sürgün ve yapraklar kullanılmıştır. Deneme aşağıda anlatılan şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. Konukçu patlıcan bitkisi üzerinde çoğaltılan *M. persicae* yaprak bitlerinden kanatsız formda olanları fırça ve emgi tüpü ile petri kabına toplanmış, beyaz ışık altında 60- 75 dakika aç bırakılmıştır.
2. Petri içerisinden 30- 35 adet yaprak biti enfekteli kayısı yaprağı üzerine alınmış ve enfekteli kayısı yaprağı doğrudan sağlıklı indikatör tütün bitkisi üzerine konulmuştur (Şekil 3. 25).



Şekil 3. 25. Üzerinde *Myzus persicae* yaprak bitleri bulunan PPV-T enfekteli kayısı yapraklarının, sağlıklı tütün bitkileri üzerindeki görüntüsü

3. Tüm indikatör bitkilere tek tek üzerinde *M. persicae* yaprak biti bulunan PPV-T enfekteli kayısı yaprağı konulduktan sonra indikatör bitkiler yaprak bitlerinin serbest beslenmesi amacıyla 100x 50x 80 (derinlik: en: yükseklik) büyüklüğündeki tel kafese konulmuş, 5 gün süreyle beslenmesi sağlanmıştır (Şekil 3. 26).
4. Deneme süresince yaprak bitlerinin indikatör bitkilere yüksek oranda geçiş yaptığı gözlenmiştir. Beşinci gün sonunda *M. persicae* yaprak bitleri insektisitle ilaçlanarak öldürülmüştür.

5. Denemede kullanılan indikatör tütün bitkilerine 4- 6 haftalık gözlem sonunda PPV'nin varlığını tespit etmek amacıyla DAS- ELISA ve real-time RT- PCR analizleri yapılmıştır.



Şekil 3. 26. *Myzus persicae* yaprak bitlerinin serbest beslenmesini sağlamak amacıyla konulduğu tül kafesin (100x 50x 80 ;derinlik: en: yükseklik) görüntüsü

İkinci taşıma denemesinde sağlıklı indikatör bitki olarak 8 adet *N. benthamiana* tütün bitkisi kullanılmıştır. Denemede mekanik inokulasyonla PPV-T enfektelenen tütün bitkisi inokulum kaynağı olarak kullanılmıştır. Deneme aşağıda anlatılan şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. Patlıcan bitkisi üzerinde çoğaltılan *M. persicae* yaprak bitlerinden yaklaşık 300 adet kanatsız form yaprak biti emgi tüpü ve fırça yardımı ile petri kabı içerisine toplanmıştır.
2. Petri içerisinde 60-75 dakika aç bırakılan yaprak bitlerinin tamamı PPV-T enfekteli tütün bitkisinin yaprakları üzerine emgi tüpü ve fırça yardımı ile aktarılmıştır (Şekil 3. 27).



Şekil 3. 27. *Myzus persicae* yaprak bitlerinin emgi tüpü ve fırça yardımı ile PPV-T enfekteli tütün bitkisine aktarılması

3. Üzerinde *M. persicae* yaprak bitleri bulunan PPV-T enfekteli tütün bitkisi, iklim odasında bulunan tül kafes içerisine yerleştirilmiş ve etrafına 8 adet sağlıklı indikatör tütün bitkisi konulmuştur (Şekil 3. 28).
4. PPV-T enfekteli tütün bitkisinde serbest olarak beslenen yaprak bitlerinin, 20 gün süresince enfekteli tütünden diğer sağlıklı tütün bitkilerine geçişleri izlenmiştir.
5. Deneme sonrasında tütün bitkileri insektisitle ilaçlanarak öldürülmüştür.
6. İndikatör tütün bitkileri 3 hafta daha simptomolojik değişim için gözlenmiş ve daha sonra bitkilere, PPV'nin varlığını tespit etmek amacıyla DAS- ELISA ve real-time RT- PCR analizleri yapılmıştır.



Şekil 3. 28. *Myzus persicae* yaprak bitlerinin serbest beslenmesini sağlamak amacıyla tül kafes içerisine yerleştirilen PPV-T enfekteli tütün bitkisi ve sağlıklı indikatör tütün bitkileri

3.2.1.4.2.2. *Aphis gossypii* ile Tütün (*Nicotiana benthamiana*) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemeleri

KBY ile deneysel taşıma denemesinde indikatör bitki olarak 10 adet sağlıklı *N. benthamiana* tütün bitkisi kullanılmış, enfeksiyon kaynağı olarak da PPV-T ile enfekteli tütün bitkisi kullanılmıştır. Yaklaşık 300 adet kanatsız form *A. gossypii* yaprak biti emgi tüpü ve fırça yardımı ile petri kabı içerisine toplanmıştır. Petri içerisinde 60- 75 dakika aç bırakılan yaprak bitleri PPV-T enfekteli tütün bitkisinin yaprakları üzerine yine emgi tüpü ve fırça yardımı ile aktarılmıştır. PPV-T enfekteli tütün bitkisi, iklim odasında bulunan tül kafes içerisine yerleştirilmiş ve etrafına 10 adet sağlıklı tütün bitkisi konulmuştur. Birkaç günlük takip sonucunda *A. gossypii* yaprak bitlerinin tütün bitkisinde beslenmediği ve öldüğü görülmüş ve deneme sonlandırılmıştır.

3.2.1.5. DAS- ELISA Analizleri

PPV-T'nin yaprak bitleri ile taşıma denemelerinde simptomatolojik gözlem sonunda indikatör bitkilere öncelikli olarak DAS-ELISA analizleri yapılmıştır. DAS-ELISA analizleri Clark ve Adams (1977)'a göre yapılmıştır. Analizde spesifik monoklonal antibody olarak 'PPV Detection Magic DAS-ELISA® 5B-IVIA Universal'

(Cambra ve ark., 2006) kullanılmıştır. DAS-ELISA analizinde kullanılan tampon çözeltiler SEDIAG markasına ait hazır tampon çözeltilerdir. Tampon çözeltilerin içeriği Ek1’de belirtildiği gibidir.

DAS-ELISA analizi aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. IgG’lerin Kaplanması:

IgG tampon çözeltisine 1: 100 oranında IgG eklenmiş ve örnek sayısı kadar plakadaki her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Plaka + 37 °C’de 4 saat inkübe edilmiştir.

2. Yıkama Aşaması:

Plaka üzerindeki coating tamponu plakanın ters çevrilip silkelmesi ile uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklara washing tampon çözeltisi konulmuş ve plaka tekrar ters çevrilip silkelenerek washing tamponu uzaklaştırılmıştır. Bu işlem 3- 4 kez tekrarlanmış ve plaka peçete üzerinde vurma hareketi ile kurutulmuştur.

3. Bitki Ekstraktı Ekleme Aşaması:

200 mg yaprak örneği, örnek ezme poşetine (Bioreba) toplanmıştır. Örnekler üzerine 10 ml örnek genel örnek ezme tampon çözeltisi eklenmiş ve örnekler el homojenizatörü ile ezilmiştir. Her örnekten 100 µl ekstrakt alınarak plakadaki kuyucuklara eklenmiştir. Plaka tüm gece + 4 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda plaka yıkama aşamasında anlatıldığı gibi yıkanmıştır.

4. Conjugate Ekleme Aşaması:

Conjugate tampon çözeltisine 1: 1000 oranında enzimle işaretli IgG eklenir ve örnek sayısı kadar plakadaki her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Plaka + 37 °C’de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda plaka yıkama aşamasında anlatıldığı gibi yıkanmıştır.

5. Substrate Ekleme Aşaması:

Substrate tampon çözeltisi içerisine 1 mg/ml olacak şekilde nitrofenyl phosphate (PNPP) eklenmiştir. Plaka üzerindeki her kuyucuğa karışımdan 100 µl olacak şekilde yüklenmiştir. 1- 2 saat + 37 °C’de inkübe edilmiştir. Plaka gözlemsel olarak değerlendirilmiş ve ELISA okuyucusunda 405 nm’de okuma yapılmıştır.

3.2.1.6. Nükleik Asit (RNA) İzolasyonu

Taşıma denemelerinde kullanılan indikatör bitkilerden nükleik asit izolasyonu, High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Version 18) ile firmanın protokolü doğrultusunda yapılmıştır. Kit içerisinde bulunan kimyasalların analize hazırlanma aşaması Ek 2’de anlatıldığı gibidir.

Nükleik asit izolasyonu aşağıdaki şekilde gerçekleşmiştir:

1. İndikatör bitkilerin symptom gösteren yapraklarından veya üstteki genç yapraklarından alınan yaklaşık 200 mg örnek, örnek ezme poşetine (Bioreba) konulmuştur ve üzerine 2 ml fosfat tampon çözeltisi (PBS 1X, PVP, Tween20) eklenerek el homojenizatörü ile ezilmiştir. Ezilen her bir ekstrakt içerisinden 200 µl alınmış ve ependorf tüplere aktarılmıştır.
2. Tüpler üzerine 200 µl Binding tampon çözeltisi ve 50 µl proteinaz K eklenerek vorteks yardımı ile karıştırılmıştır. NOT: Kullanımdan hemen önce Binding tampon çözeltisine Poly A eklenmiştir (50 µl Poly A/ 2,5 ml binding).
3. Tüpler 72 °C’de 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüplere tekrardan 100 µl Binding tampon çözeltisi (Poly A eklenmiş) eklenmiştir.
4. Örnekler toplama tüpü içerisine yerleştirilmiş olan filtreye alınmış ve 8000 g’de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
5. Santrifüj işleminden sonra, toplama tüpleri atılmış filtre yeni toplama tüpleri içerisine konulmuştur.

6. Filtre üzerine 500 µl Inhibitor Removal tampon çözeltisi eklenmiş ve 8000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
7. Santrifüj işleminden sonra, toplama tüpleri atılmış filtre yeni toplama tüpleri içerisine konulmuştur.
8. Filtre üzerine 450 µl Washing tampon çözeltisi eklenmiş ve 8000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
9. Santrifüj işleminden sonra, toplama tüpleri atılmış filtre yeni toplama tüpleri içerisine konulmuştur.
10. 8 nolu basamak aynen tekrar edilmiştir.
11. Toplama tüpü içerisindeki sıvı dökülerek uzaklaştırılmıştır. Filtre tekrardan aynı toplama tüpü içerisine konulmuş ve 13,000 g'de 10 saniye santrifüj edilmiştir.
12. Toplama tüpü atılmış, filtre 1,5 ml'lik ependorf tüplere alınmıştır.
13. Filtre üzerine 50 µl Elution tampon çözeltisi eklenmiş ve 8000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
14. Filtre atılmış ve ependorf tüpteki RNA PCR analizleri yapılana kadar – 80 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.1.7. Real-time RT-PCR Analizleri

Real-time RT-PCR analizleri, RNA izolasyonu sonrası yapılan real-time RT-PCR ve RNA izolasyonu yapmaksızın naylon membrana damlatılmış bitki/ böcek örneklerinin hazırlanması sonrası yapılan spot real-time RT-PCR olmak üzere iki farklı analiz aşaması içermektedir.

3.2.1.7.1. RNA İzolasyonu Sonrası Real-time RT-PCR Analizi

Real-time RT- PCR analizleri Wetzel ve ark., (1991) tarafından düzenlenen genel PPV teşhis primer dizileri kullanılarak TIB MOLBIOL (Syntheselabor GmbH) firmasına sentezletilen primer ve prob ile gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3. 2). Real-time RT- PCR master miks hazırlığında RNA Virus Master (Roche, Verison 08) hazır kiti kullanılmıştır. Kitin içeriği Çizelge 3. 3’de belirtildiği gibidir. Buna göre hazırlanan karışımda 0,4 µl enzim, 4 µl reaksiyon buffer, F1 primer 0,5 µM, R1 primer 0,5 µM, R2 primer 0,5 µM, prob 0,2 µM ve 5 µl viral RNA yer almıştır. Karışımın son hacmi 20 µl olup, PCR koşulları 1 döngü 50 °C’de 8 dakika, 1 döngü 95 °C’de 30 saniye, 45 döngü 95 °C’de 1 saniye, 55 °C’de 30 saniye, 72 °C’de 1 saniye ve son olarak 40 °C’de 30 saniye şeklinde belirlenmiştir.

Çizelge 3. 2. Real time RT- PCR analizinde kullanılan primer/ prob dizilimleri

Primer/ Prob	Primer yönü	Sekans uzunluğu (bp)	Amplikon uzunluğu (bp)	Primer dizilimi (5’- 3’)
F1	İleri	20	243	ACCGAGACCACTACACTCCC
R1	Geri	20		CAGAYTACAGYCTCGCCAGA
R2	Geri	20		CAGACTACAGCCTCGCCAGA
Prob	-	25	-	5’-FAM- ATTTGGCTTGGATGGAAACGTCG GA-TAMRA-3’

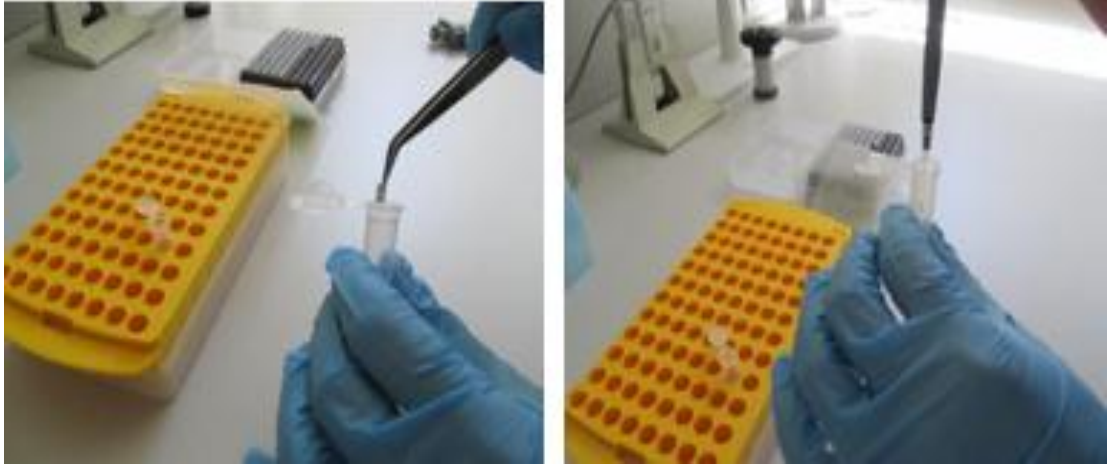
Real-time RT- PCR analizi Light Cycler® 480 II Roche cihazında gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları ise LightCycler® 480 Software (release 1.5.0 SP3 Version 1.5.0.39)’de eşik değerleri (CT) göz önüne alınarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 3. 3. Real-time RT-PCR reaksiyon karışımı (RNA Virus Master; Roche)

Real-time RT-PCR Reaksiyon Karışımı	Konsantrasyon	1X Hacim (µl)
d ₂ H ₂ O	-	7,2
Primer (F1)	0,5 µM	1
Primer (R1)	0,5 µM	1
Primer (R2)	0,5 µM	1
Probe	0,2 µM	0,4
Enzim	1 fold	0,4
Reaksiyon Tamponu	1 fold	4
Toplam reaksiyon karışımı		15
RNA		5
Son Hacim		20

3.2.1.7.2. Örneklerin Spot Real-time RT-PCR İçin Hazırlanması ve Spot Real-time RT-PCR Analizi

Spot real-time RT-PCR için örnekler Olmos ve ark (2005)'e göre hazırlanmıştır. Bitki örnekleri, ekstraksiyon tampon çözeltisi (PBS+ % 2 PVP+ % 0,2 DIECA) ile plastik torbalarda (Bioreba) el homojenizatörü yardımı ile ezilmiştir. Örnekler, küçük parçalara kesilerek 1,5 ml'lik ependorf tüplere alınmış nitroselüloz naylon membran (3MM Whatman) üzerine 5 µl olacak şekilde mikropipet yardımı ile damlatılmıştır (Şekil 3. 29). Yaprak bitlerinin spot real-time RT- PCR analizleri de, yaprak bitlerinin naylon membranlarda doğrudan ezilmesiyle olmaktadır. PPV hedeflerini nitroselüloz membrandan ayırmak için membranın bulunduğu tüpe % 0.5 Triton-X eklenmiş, tüpler 95 °C'de 10 dakika su banyosunda bekletilmiş, vorteksle karıştırılmış ve kısa bir sanrifüjden sonra doğrudan real-time RT- PCR için kullanılmıştır.



Şekil 3. 29. Spot real-time RT-PCR analizi için küçük parçalara kesilmiş membranın (3MM Whatman)ependorf tüp içine yerleştirilmesi (solda) ve üzerine bitki ekstraktı eklenmesi (sağda)

Real-time RT-PCR analizi Olmos ve ark. (2005) tarafından düzenlenen TaqMan real-time RT-PCR yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Real-time RT-PCR analizinde kullanılan primer ve prob sekans uzunlukları Çizelge 3. 4' de belirtildiği gibidir.

Çizelge 3. 4. Real-time RT-PCR analizinde kullanılan primer/prob dizilimleri (Olmos ve ark., 2005)

Primer/ Prob	Sekans Uzunluğu (bp)	Amplikon uzunluğu (bp)	3 Primer dizilimi (5'- 3')
P241	22	76	CGTTTATTTGGCTTGGATGGAA
P316D	22		GATTAACATCACCAGCGGTGTG
P316M	22		GATTCACGTCACCAGCGGTGTG
PPV-DM Prob	27	-	5'FAM- CGTCGGAACACAAGAAGAGGAC ACAGA-TAMRA3'

Real-time RT-PCR hazırlığında AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit (Applied Biosystems) kullanılmıştır. Master miks kitinin içeriği Çizelge 3. 5'deki gibidir. Bu yöntemle göre reaksiyon karışımında 1XTaqMan Universal PCR Master Mix (Applied biosystems), 1XMultiScribe and RNase Inhibitor Mix (Applied Biosystems), 1 µM

P241 primer, 0,5 µM P316D ve P316M primerleri, 200 nM TaqMan probu ve 3 µl membrandan elde edilen nükleik asit ekstraktı yer almıştır. Toplam hacim 12 µl olup PCR koşulları 45 °C 10 saniye, 95 °C 10 saniye, 45 döngü 95 °C’de 15 saniye, 60 °C’de 45 saniye şeklinde uygulanmıştır. Reaksiyon sonuçları ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) cihazının software doğrultusunda ortaya çıkan eşik değerlerine göre (CT) değerlendirilmiştir.

Çizelge 3. 5. Real-time RT-PCR reaksiyon karışımı (AgPath-ID™, Applied Biosystems)

Real-time RT-PCR Reaksiyon Karışımı	Konsantrasyon	1X Hacim (µl)
d ₂ H ₂ O	-	1,89
P241	0,5 µM	0,12
P316D	0,5 µM	0,06
P316M	0,5 µM	0,06
Probe (5uM STQ)	0,2 µM	0,37
25x Enzim Mix	1 fold	0,5
2x RT-PCR Tamponu	1 fold	6
Toplam reaksiyonkarışımı	9	
Nükleik asit ekstraktı (RNA)	3	
Son Hacim	12	

3.2.2. ‘Melez Kayısı Bitkilerinde PPV’ye Dayanıklılığın Moleküler Markörlerle Araştırılması’ Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler

3.2.2.1. Melez Bitkilerin Temini ve Muhafazası

Çalışmalarda kullanılan melez kayısı bitkileri Malatya İnönü Üniversitesi Kayısı Araştırma Merkezi tarafından elde edilen her bir melezin yapraklanma dönemini takiben sürgün ve yaprak örnekleri alınmış, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi’ne plastik torbalar içerisinde gönderilmiştir. Malatya’dan temin edilen örneklerin yaprakları, alüminyum folyoya sarılmış ve derhal sıvı azotta dondurularak nükleik asit izolasyonu yapılncaya kadar -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.2. Melez Bitkilerden DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu yapılacak olan bitki örnekleri PPV’ye dayanıklı çeşit olan Stark Early Orange (SEO) ile melezlenen yerli çeşitlerin melezlerinden oluşmuştur. Melezlemelerdeki kombinasyonlar ve bu kombinasyonlar sonucu elde edilen melezler içerisinden kullanılan bitki sayıları Çizelge 3. 6’da verilmiştir. Örneklerin DNA ekstraksiyonları küçük değişikliklerle CTAB yöntemiyle (Doyle ve Doyle, 1987) yapılmıştır.

DNA izolasyonu aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir:

1. 50 mg dondurulmuş yaprak dokusu sıvı azot ile ezilerek toz haline getirilmiştir.
2. Örnek üzerine 500 µl %2 CTAB tampon çözeltisi eklenmiş ve karıştırılmıştır.
3. Ekstrakt 1,5 ml’lik ependorf tüp içerisine alınmış ve 60 °C’de 45 dakika inkübe edilmiştir.
4. Ekstrakt üzerine 500 µl 24:1 oranında kloroform:izoamilalkol eklenmiş ve tüp kapağı kapatılarak ters düz etmek suretiyle iyice karıştırılmıştır.
5. Tüpler 13000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
6. Santrifüjden sonra en üst katmandaki yaklaşık 350 µl’lik sıvı faz yeni 1,5 ml’lik ependorf tüplere alınmıştır.
7. Tüp üzerine 30 µl (0.08 hacim, 7.5 M) soğuk amonyum asetat ve 200 µl (0.54 hacim) soğuk izopropanol eklenmiş; iyice karıştırılmıştır.

8. Örnek -20 °C’de 1 saat bekletilmiştir.
9. 1 saat sonunda dondurucudan alınan örnek 18.000 rpm’de 3 dakika santrifüj edilmiştir.
10. Sıvı faz pipetlenerek atılmış, çökelti üzerine 700 µl %70 soğuk ethanol eklenmiş ve tüp ters düz edilerek karıştırılmıştır.
11. Tüp santrifüje yerleştirilmiş, maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir.
12. Sıvı faz dikkatlice pipetlenerek uzaklaştırılmıştır.
13. Çökelti üzerine 700 µl %95 soğuk ethanol eklenmiş ve tüp ters düz edilerek karıştırılmıştır.
14. Tüp santrifüje yerleştirilmiş, maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir.
15. Sıvı faz dikkatlice pipetlenerek uzaklaştırılmıştır.
16. Çökelti vakum santrifüjde veya 55 °C’de inkübatör içerisinde kurutulmuştur.
17. Kuruyan çökelti üzerine 100 µl TE tamponu eklenerek DNA çözülmüştür.
18. DNA PCR yapılana kadar -20 ° C’de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3. 6. Melez kayısı çeşitlerinin ebeveyn kombinasyonları ve bu kombinasyonlardan DNA izole edilen bitki sayısı

Sıra	Melez Çeşitler	DNA İzole Edilen Bitki Sayısı
1	Hacıhaliloğlu x Stark Early Orange	11
2	Adilcevaz 5 x Stark Early Orange	14
3	Çöloğlu x Stark Early Orange	10
4	Şekerpare x Stark Early Orange	15
5	Stark Early Orange x Adilcevaz5	20
6	Stark Early Orange x Hacıhaliloğlu	9
7	Stark Early Orange x Şekerpare	22
8	Stark Early Orange x Çataloğlu	33
Toplam		134

3.2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR)

Analizleri

PPV dayanıklılığının moleküler markırlarla taranması çalışmasında DNA izolasyonu yapılan örneklerin PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Şarkaya dayanıklı kayısı hatlarının seçiminde Soriano ve ark. (2012) tarafından PGS1.21 ve PGS1.23 olarak isimlendirilmiş olan SSR primerleri kullanılmıştır. PCR ürünleri kapillar elektroforez yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu nedenle, PCR ürünlerinin işaretlenmesinde FAM ile işaretlenmiş M13 primeri kullanılmıştır. Markırların forward primerlerine 5'ucundan M13(-21) dizileri eklenmiştir (Schuelke, 2000). Her bir reaksiyon karışımı toplam 20 µl'den oluşmuştur. Tek bir reaksiyon karışımında 2 µl 10X Buffer (MBI Fermentas, GmbH, Germany), 1,2 µl MgCl₂ (MBI Fermentas, GmbH, Germany), 0,2 µl dNTP'ler (MBI Fermentas, GmbH, Germany), 0,8 µl forward primer, 1,6 µl reverse primer, 0,8 µl FAM ile işaretli M13(-21), 0,1 µl Taq DNA polimeraz (MBI Fermentas, GmbH, Germany) ve 2 µl DNA ile hazırlanan reaksiyon karışımları termal döngü (thermocycler) cihazına yerleştirilmiştir (Çizelge 3. 7 ve Çizelge 3. 8). Amplifikasyon için termal döngü cihazı 1 döngü 94 °C'de 2 dakika denatürasyon, 30 döngü 94 °C'de 30 saniye, 50 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 1 dakika ve 72 °C'de 7 dakika son uygulamaya programlanmıştır.

Çizelge 3. 7. PPV dayanıklılık çalışmasında yapılan PCR analizinin reaksiyon karışımı

PCR reaksiyon karışımı	PGS1.21	PGS1.23
	1X µl	1X µl
d ₂ H ₂ O	11,3	12,3
bX10	2	2
MgCl ₂ (25 mM)	1,2	1,2
dNTPs (10 mM)	0,2	0,2
Taq polymerase	0,1	0,1
M13 primer (FAM işaretli) (10 mM)	0,8	0,8
PPVprimer (forward) (10 mM)	0,8	0,8
PPVprimer (reverse) (10 mM)	1,6	1,6
Toplam reaksiyon karışımı	18	
DNA	2	
Son hacim	20	

3.2.2.4. PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi: Agaroz Jel Elektrophorezi

PCR ürünlerinin görsel hale getirilmesi amacıyla reaksiyondan sonra ürünlerin %1.2 agaroz jelde elektroforezi yapılmıştır. Elektroforez 1XTAE ortamında yapılmış, aynı ortam jelin hazırlanmasında da kullanılmıştır. Jele, 3 µl yükleme boyası (6X Loading Dye; MBI Fermentas, GmbH, Germany) ile birlikte 7 µl yüklenen PCR ürünleri, 110 V'da 40 dakika süreyle elektroforeze tabi tutulmuştur. Elektroforez sonrasında jel 1 mg/ml etidyum bromid (EtBr) içeren 1XTAE ortamında 5- 10 dakika bekletilerek boyanmıştır. UV transillüminatörde sonuçlar gözlenmiş ve amplifikasyon gerçekleşen hatlar belirlenmiştir. Amplifikasyonu gerçekleşen PCR ürünlerinin daha sonra kapillar elektroforezde fragment analizi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3. 8. PPV'ye dayanıklılığın moleküler markörlerle taranması çalışmasında kullanılan primer dizilimleri

Primer adı	Primer yönü	Amplikon uzunluğu (bp)	Primer dizilimi (5'- 3')
FAM işaretli M13 (-21)	-	-	FAM-5'-ACGACGTTGTAAAACGAC
PGS1.21	İleri Geri	205	ACGACGTTGTAAAACGACccctggtgttctgctctc CATCCACAAATGGGAAGCAT
PGS1.23	İleri Geri	235	ACGACGTTGTAAAACGACtttgtatttttgggttg CAGGCTTTTTATGTCCTCCT

3.2.2.5. PCR Ürünlerinin Kapiller Elektrophorezi

Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji Laboratuvarı'nda PCR analizi yapılan örneklerin bir kısmının kapiller elektroforezi ticari bir firmaya yaptırılmış, bir kısmının ise Niğde Üniversitesi, Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi'nde ABI 3500xL Sequance Analyzer cihazında fragment analizi yapılmıştır.

Fragment analizinde tek bir reaksiyon karışımında 9 µl Hi-Di formamide (Applied Biosystem), 0,5 µl Gene Scan-500 LIZ size Standard (Applied Biosystem), 0,5 µl DNA eklenerek son hacim 10 µl olarak ayarlanmıştır (Çizelge 3. 9). Fragment analizi öncesinde örnekler 95 °C'de 3-5 dakika denatüre edilmiş, - 20 °C'de 3 dakika bekletilmiş ve sonra ABI 3500xL Sequance Analyzer cihazına yüklenmiştir. Fragment analizi tamamlanan örneklerin GeneMapper software 4.0 versiyonu ile analiz sonuçları değerlendirilmiştir.

Çizelge 3. 9. Fragment analizinin reaksiyon karışımı

Reaksiyon karışımı	1X µl
Hi-Di Formamide	9
Gene Scan-500 LIZ size Standard	0,5
Master miks	9,5
DNA	0,5
Son hacim	10

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Bu çalışmada elde edilen bulgular 2011- 2014 yılları arasında yaklaşık olarak dört yıllık bir zaman dilimini kapsamaktadır. Elde edilen bulgular, ‘*Plum pox virus* (PPV) T ırkının bazı biyolojik özelliklerinin araştırılması’ ve ‘melez kayısı bitkilerinde PPV’ye dayanıklılığın moleküler markörlerle belirlenmesi’ olmak üzere iki ana başlık altında yapılan çalışmaları içermektedir.

4.1. ‘*Plum pox virus* (PPV) T Irkının Bazı Biyolojik Özelliklerinin Araştırılması’ Çalışmalarının Bulguları

4.1.1. Mekanik Yolla PPV-T Enfeksiyonu Yapılan Bitkilerin Simptomatolojik Gözlemleri, DAS-ELISA ve Real-time RT-PCR Analizleri

PPV-T’nin mekanik inokulasyonla otsu konukçularına taşınması çalışmalarında, enfekteli kayısı bitkisinden 10 adet *N. benthamiana* tütün bitkisine mekanik inokulasyonla taşıma gerçekleştirilmesinden 3 hafta sonra ilk virüs belirtileri gözlenmiştir. 3- 4 haftalık simptomatolojik gözlemler sonucunda 2 adet tütün bitkisinin yapraklarında geniş mozaik lekeler, damar aralarında renk değişimleri ve yaprak uçlarında kıvrılma şeklinde virüs belirtileri gözlenmiştir (Şekil 4. 1). Bitkilere yapılan DAS-ELISA ve viral RNA izolasyonu sonrasında gerçekleştirilen real-time RT-PCR analizlerinde tütün bitkilerinin PPV ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4. 1. Mekanik inokulasyonla PPV-T enfektelenen *Nicotiana benthamiana* tütün bitkisinin yapraklarındaki geniş mozaik lekeler ve renk açılmaları

Mekanik inokulasyon yöntemi ile PPV-T enfektelenen tütün bitkisini inokulum kaynağı olarak kullanmış ve 3 adet sağlıklı tütün ve 5 adet sağlıklı hıyar bitkilerine yeniden mekanik inokulasyon gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen mekanik inokulasyonlarda 3- 4 haftalık simptomatolojik gözlem sonunda 3 adet tütün bitkisinin tamamında damar aralarında renk açılmaları ve mozaik sarı lekeler gözlenmiştir (Şekil 4. 2). Hıyar bitkilerinde ise PPV'ye özgü herhangi bir symptom gözlenmemiş, yapılan DAS- ELISA ve viral RNA izolasyonu sonrasında gerçekleştirilen real-time RT- PCR analizlerinde de mekanik inokulasyon yapılan 5 adet hıyar bitkisinin tamamının PPV yönünden negatif olduğu tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar, *N. benthamiana* tütün bitkisinin PPV'ye daha hassas olduğunu ve gerek *Prunus* türlerinden tütün bitkisine yapılan inokulasyonlarda, gerekse de tütün bitkisinden tütün bitkisine yapılan mekanik inokulasyon işlemlerinde indikatör bitki olarak kullanılabileceği hususunda yapılan birçok çalışmayla (Labonne ve ark., 1995; Glasa ve ark., 2004) paralellik göstermiştir.



Şekil 4. 2. PPV-T enfekteli tütünden mekanik inokulasyonla PPV-T enfektelenen *Nicotiana benthamiana* tütün bitkisinin yapraklarındaki mozaik simptomlar ve renk açılmaları

4.1.2. PPV-T'nin Yaprak Bitleri ile Deneysel Taşıma Denemeleri

PPV-T'nin yaprak bitleri ile deneysel taşıma denemelerinde 'KBY ve SBY olmak üzere iki farklı taşıma yöntemi kullanılmıştır. Her iki yöntemin taşıma etkinliği ve denemeler sonunda yapılan DAS-ELISA ve real-time RT-PCR analizleri iki başlık altında değerlendirilmiştir.

4.1.2.1. ‘Kontrollü Beslenme Yöntemi’ (KBY) ile Deneysel Taşıma Denemeleri

4.1.2.1.1. *Myzus persicae* ile Bezelye (*Pisum sativum* ‘Colmo’; *Pisum sativum* ‘Siena’) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemelerinin DAS-ELISA ve Real-time RT-PCR Analizleri

M. persicae ile farklı zamanlarda yapılan KBY ile deneysel taşıma denemelerinde indikatör bitki olarak toplam 60 adet *P. sativum* ‘Colmo’ bezelye bitkileri kullanılmıştır. PPV-T inokulum kaynağı olarak da, PPV-T Ankara izolatu ile enfekteli Myrobalan 29C bitkisi kullanılmıştır. Bezelye bitkilerinin 45 adedinde 4- 5 haftalık yapılan simptomolojik gözlem sonucunda bitkilerde herhangi bir simptom gözlenmemiştir. Buna rağmen örneklere simptomolojik gözlem sonunda DAS-ELISA analizi yapılmıştır. Yapılan DAS-ELISA ve membrandan doğrudan gerçekleştirilen spot real-time RT-PCR analizlerinde tüm örnekler PPV yönünden negatif bulunmuştur. Taşıma denemesinde kullanılan diğer 15 adet ‘Colmo’ bezelyelerinin yapraklarında mozaik belirtiler, küçülmeler, kaşılaşmalar ve nekrozlar gözlenmiştir (Şekil 4. 3). PPV’nin bezelye bitkisindeki bu belirtileri Diaz- Vivancos ve ark. (2008)’nın yapmış olduğu çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Bezelye bitkisinin yapraklarından alınan örneklere DAS- ELISA ve spot real-time RT-PCR analizleri yapılmıştır. Yapılan DAS-ELISA analizlerinde örnekler PPV yönünden negatif bulunurken, doğrudan membrandan yapılan spot real-time RT-PCR analizinde 15 örnekten 13 tanesinin PPV yönünden pozitif olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçları teyit amacıyla spot real-time RT-PCR’de PPV pozitif bulunan 13 örnekten alınan yaprak örnekleri ile viral RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve real-time RT-PCR analizi yapılmıştır. Yapılan real-time RT-PCR analizlerinde de 13 bezelye bitkisi PPV yönünden pozitif bulunmuştur. Spot real-time RT-PCR ve real-time RT-PCR analizlerinde elde edilen bu bulgular, Capote ve ark. (2009) yaptıkları spot real-time analizlerinin validasyonu çalışmaları ile benzerlik göstermektedir. Denemelerin bazılarında hem spot real-time RT- PCR hem de RNA izolasyonu sonrası yapılan real-time RT-PCR analizleri kullanılmıştır. Ancak Capote ve ark. (2009)’nın da belirttiği gibi RNA izolasyonu yaparak gerçekleştirilen PCR temelli analiz sonuçlarının çok daha

hassas olması gözönünde bulundurulduğundan, analizlerin büyük çoğunluğu RNA izolasyonu sonrasında yapılan real-time RT-PCR ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4. 3. PPV-T'nin *Myzus persicae* ile deneysel taşıma denemesinde kullanılan 'Colmo' bezelye bitkilerinin yapraklarındaki mozaik belirtiler (1) ve bitkilerin yaprak ucunda kışıklaşmalar (2)

Denemelerde ayrıca 20 adet *P. sativum* 'Siena' bitkisi kullanılmıştır. Bu bitkilerle kurulan taşıma denemelerinde 4- 5 haftalık simptomolojik gözlem süresince bitkilerde hiçbir semptom gözlenmemiştir. Bezelye bitkileri, DAS-ELISA, spot real-time RT-PCR ve viral RNA izolasyonu sonrasında yapılan real-time RT-PCR analizlerinde de PPV yönünden negatif bulunmuştur.

Denemelerde, ortam kontrol amaçlı kullanılan PPV-T'den ari 10 adet bezelye bitkisinde denemeler süresince hiçbir semptom gözlenmemiştir. Deneme sonunda bu bitkilerin, DAS- ELISA analizi, viral RNA izolasyonu sonrasında yapılan real time RT-PCR analizi ve doğrudan membrandan yapılan spot real-time RT- PCR analizinde de PPV yönünden negatif olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, *M. persicae* ile PPV-T'nin KBY ile 'Colmo' bezelyelerine % 21.60 oranında deneysel taşıması gerçekleştirilmiştir. Buna göre yapılan bu çalışmada elde edilen bulgular, *M. persicae* ile PPV-M'nin otsu konukçularına deneysel taşıma çalışmasında *P. sativum*'a % 24.00 oranında PPV'nin taşındığını bildiren Manachini ve ark. (2007) ile benzerdir. Ayrıca bu sonuçlar, Wallis ve ark. (2007)'ın PPV PENN3 ve

PPV PENN4 izolatlarının *M. persicae* ile ‘Colmo’ bezelye bitkisine % 3-5 oranlarında deneysel taşıma gerçekleştirdiğini bildirdiği çalışmaları ile de benzerlik göstermektedir.

4.1.2.1.2. *M. persicae* ile Tütün (*Nicotiana benthamiana*) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemelerinin DAS-ELISA ve Real-time RT-PCR Analizleri

KBY metodu ile kurulan denemelerde PPV-T’nin *M. persicae* ile deneysel taşınması araştırılmıştır. Denemelerde toplam 80 adet indikatör tütün (*N. benthamiana*) bitkisi ve üç farklı PPV-T inokulum kaynağı (PPV-T doğal enfekteli kayısı bitkisi, mekanik inokulasyonla PPV-T enfektelenmiş *N. benthamiana* tütün bitkisi ve PPV-T Ankara izolatı ile enfekteli Myrobalan 29C bitkisi) kullanılmıştır.

PPV-T enfekteli kayısından *M. persicae* ile tütün bitkisine taşıma denemelerinde kullanılan 60 adet *N. benthamiana* tütün bitkilerinden 23 tanesi simptomolojik gözlem esnasında ölmüştür. Diğer 37 tütün bitkisi ise 4- 5 hafta süresince iklim odasında simptomolojik olarak takip edilmiş, ancak bitkilerde simptomolojik olarak bir değişiklik gözlenmemiştir. *N. benthamiana* tütün bitkilerine yapılan DAS-ELISA analizinde bitkilerin tamamı PPV yönünden negatif bulunurken, doğrudan membrandan yapılan spot real-time RT-PCR analizinde 37 adet tütün bitkisinden 2 tanesi PPV pozitif bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar, PCR temelli analizlerin PPV teşisinde hassasiyetinin DAS-ELISA analizlerine oranla daha yüksek olduğunu belirten çalışmalarla (Wetzel ve ark., 1991; Levy ve Hadidi, 1994; Candresse ve ark., 1995; Faggoli ve ark., 1998; Schneider ve ark., 2004) paralellik göstermektedir.

PPV-T enfekteli Myrobalan 29C bitkisi ile 10 adet *N. benthamiana* tütün bitkisine yapılan deneysel taşıma denemeleri sonunda, indikatör tütün bitkileri 4- 5 hafta süresince iklim odasında simptomolojik olarak gözlenmiştir. Taşıma denemelerinden üç hafta sonra 10 adet tütün bitkisinden sekizinin bazı alt yapraklarında mozaik benzeri belirtiler gözlenmiştir. Ancak bitkiler, DAS-ELISA ve membrandan doğrudan gerçekleştirilen spot real-time RT-PCR analizlerinde PPV negatif bulunmuştur. Bu sonucun, Cambra ve ark. (2006)’ın yaptıkları çalışmalarda da belirttiği gibi PPV her ne kadar sistemik bir virüs ise de virüsün bir şekilde bazı yapraklarla sınırlı kalmış olabileceği ve analizler için örnek olarak alınan diğer yaprakların da virüs konsantrasyonunu iyice azaltmış olması olasılıklarıyla örtüştüğü düşünülmektedir.

Ayrıca bitkiler çevresel faktörlere tepki olarak da bazen virüs benzeri mozaik simptomlar oluşturabilmektedirler. Bu da göz önünde bulundurulduğunda, bitkilerin yapraklarında simptomolojik değişim gözlenmesine rağmen yapılan analizlerin PPV-T yönünden negatif olması da diğer bir neden olarak düşünülmektedir.

PPV-T enfekteli tütün (*N. benthamiana*) bitkisinden *M. persicae* ile indikatör *N. benthamiana* tütün bitkisine PPV-T taşıma denemeleri sonunda, indikatör tütün bitkileri 4- 5 hafta süresince simptomolojik olarak gözlenmiştir. Simptomolojik gözlemler sonunda 10 indikatör tütün bitkisinden 3 nolu (Şekil 4. 4) ve 7 nolu (Şekil 4. 5) örneklerin yaprak damarlarında bant şeklinde koyulaşmalar, damar aralarında renk açılmaları, mozaik lekelenmeler, yaprak uçlarında kıvrılmalar ve yaprak üzerinde kabartılar gözlenmiştir. Tütün bitkilerinden alınan yaprak örneklerine yapılan DAS-ELISA ve RNA izolasyonu sonrasında yapılan real-time RT-PCR analizlerinde 2 ve 7 nolu bitki PPV pozitif bulunurken (Şekil 4. 6 ve Şekil 4. 7) geriye kalan 8 bitki PPV negatif tespit edilmiştir.



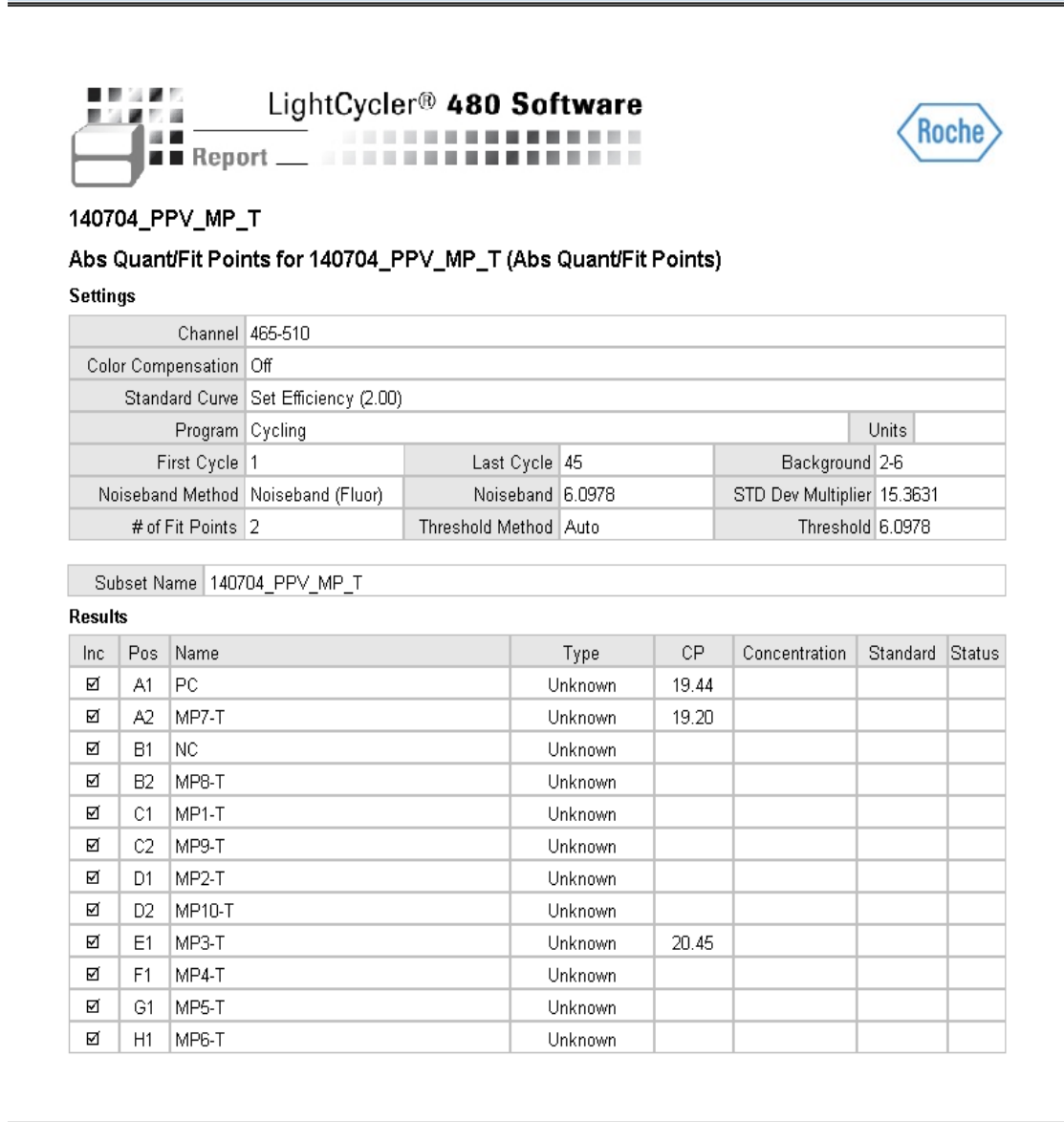
Şekil 4. 4. *Myzus persicae* ile PPV-T deneysel taşıma denemesinde kullanılan, yaprak damarlarında bantlaşma, damar aralarında renk açılmaları ve yaprak üzerinde kabartılar gözlenen 3 nolu *Nicotiana benthamiana* tütün bitkisi



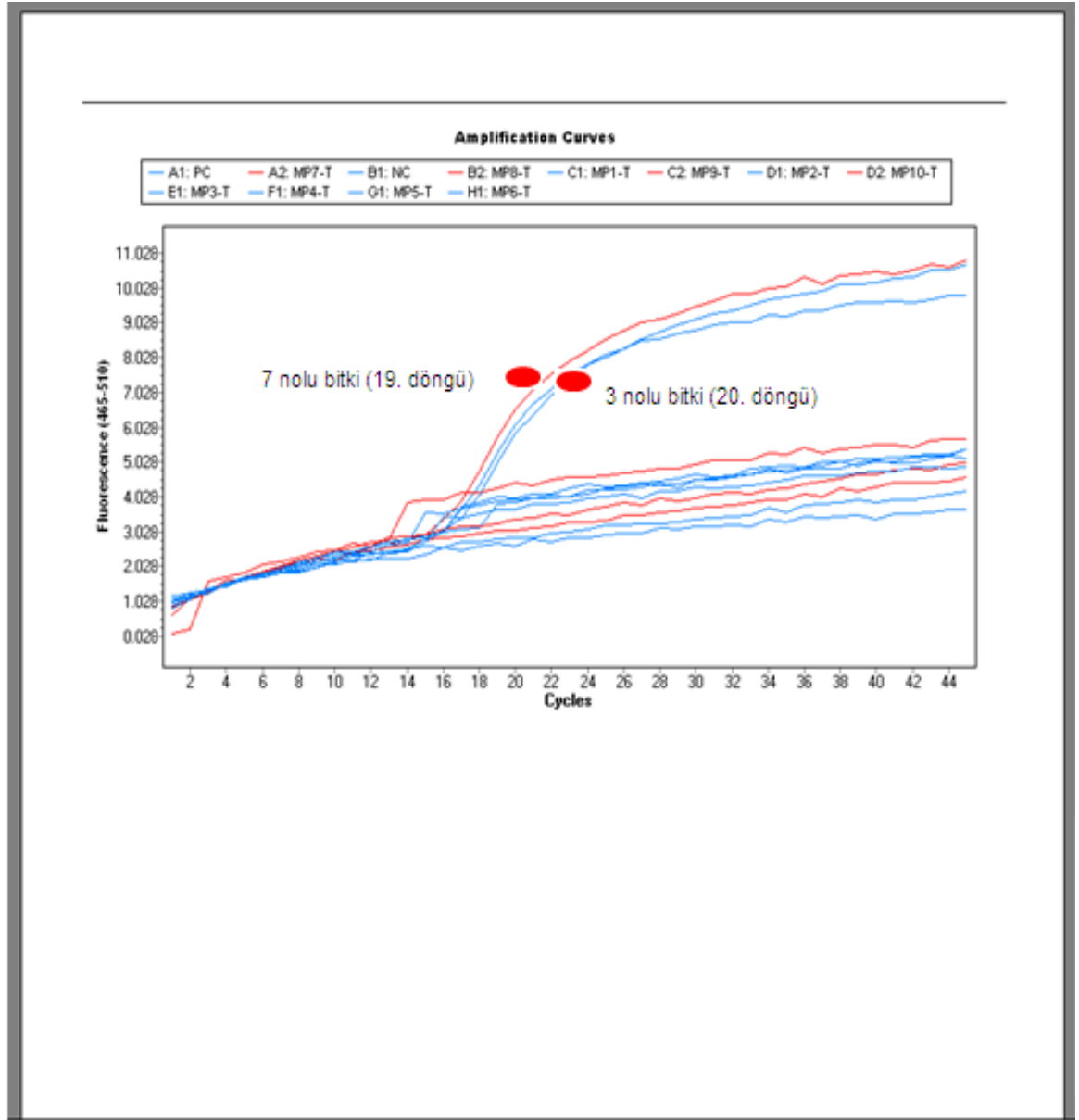
Şekil 4. 5. *Myzus persicae* ile PPV-T deneysel taşıma denemesinde kullanılan, damar aralarında açılmalar, damarlarda koyu renklemeler, yaprak uçlarında kıvrılmalar ve şekil bozuklukları gözlenen 7 nolu *Nicotiana benthamiana* tütün bitkisi

Sonuç olarak, *M. persicae* ile PPV-T'nin KBY metodu kullanılarak *N. benthamiana* tütün bitkisine deneysel taşıma denemelerinde, inokulum kaynağı olarak PPV-T enfekteli kayısı kullanıldığında % 5.40, PPV-T enfekteli kayısından mekanik inokulasyonla enfektelenmiş *N. benthamiana* tütün bitkisi kullanıldığında % 20.00 ve PPV-T Ankara izolatu ile enfekteli Myrobalan 29C kullanıldığında ise % 0 oranlarında taşıma sağlanmıştır. Bu sonuçlar, Glasa ve ark. (2004) tarafından yapılan farklı PPV izolatlarının farklı taşınma etkinliği olduğunu belirten çalışmalarıyla benzerdir. Ayrıca bu çalışma, Wallis ve ark. (2007) tarafından otsu inokulum kaynağı kullanılarak yine

otsu indikatör bitkiye PPV'nin *M. persicae* ile taşıma denemelerinin daha başarılı olduğunu belirttikleri çalışmayı da desteklemektedir.



Şekil 4. 6. Viral RNA izolasyonu sonrasında real-time RT-PCR ile PPV tespit edilen 3 (MP3- T) ve 7 (MP7- T) nolu bütün bitkilerinin real-time Roche 480 II cihaz verilerine göre analiz sonuç raporu. Analiz sonucuna göre 3 nolu bitki 20.45 CP (20'nci Döngü)'de pozitif sonuç vermiş, 7 nolu örnek ise 19.20 CP (19'uncu Döngü)'de pozitif sonuç vermiştir. CP: Crossing point (DNA çoğalmasının görünebilir olduğu ilk nokta); PC: Pozitif kontrol (PPV-M); NC: Negatif kontrol (Su kontrol); MP: *Myzus persicae*



Şekil 4. 7. Viral RNA izolasyonu sonrasında real-time RT-PCR ile PPV pozitif tespit edilen 3 (MP3- T) ve 7 (MP7- T) nolu bütün bitkilerinin ve pozitif kontrolün real time Roche 480 II cihaz verilerine göre DNA amplifikasyon eğrisi. MP: *Myzus persicae*

4.1.2.1.3. *Aphis gossypii* ile Bezelye (*Pisum sativum* ‘Colmo’; *Pisum sativum* ‘Siena’) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemelerinin DAS-ELISA ve Real-time RT-PCR Analizleri

A. gossypii ile farklı zamanlarda KBY’ye göre yapılan deneysel taşıma denemelerinde indikatör bitki olarak 30 adet *P. sativum* ‘Colmo’ ve 20 adet *P. sativum* ‘Siena’ olmak üzere toplam 50 adet sağlıklı bezelye bitkisi kullanılmıştır. Ayrıca denemelerde inokulum kaynağı olarak PPV-T Ankara izolatu ile enfekteli Myrobalan 29C bitkisi kullanılmıştır. Denemeler sonunda bezelye bitkilerine 4-5 hafta simptomolojik gözlem yapılmış, ancak herhangi bir viral simptom gözlenmemiştir. ‘Siena’ ve ‘Colmo’ bezelyelerine yapılan DAS-ELISA ve real-time RT-PCR analizlerinde bitkiler PPV bakımından negatif bulunmuştur. Benzer bir çalışmada, Avinent ve ark. (1991) *A. gossypii* ile PPV taşıma denemesini başarıyla sonuçlandırırken, Labonne ve ark. (1995), PPV’nin KBY’ye göre deneysel taşıma denemelerinde PPV’yi aktif taşıyamadığını bildirmiştir.

4.1.2.1.4. *Aphis gossypii* ile Tütün (*Nicotiana benthamiana*) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemelerinin DAS-ELISA ve Real-time RT-PCR Analizleri

A. gossypii ile KBY metoduna göre kurulan deneysel taşıma denemesinde indikatör bitki olarak 20 adet *N. benthamiana* tütün bitkisi kullanılmış, inokulum kaynağı olarak da PPV-T ile enfekteli tütün bitkisi kullanılmıştır. PPV-T taşıma denemesinden 5 hafta sonrasında 2 nolu (Şekil 4. 8) ve 8 nolu (Şekil 4. 9) *N. benthamiana* tütün bitkilerinin yaprak damar aralarında sararmalar, üst yapraklarında sarı mozaik lekeler ve küçülmeler gözlenirken 5 nolu (Şekil 4. 10) bitkinin yaprak damarlarında çok hafif renk açılmaları ve üst yapraklarda küçülme ve kıvrılmalar gözlenmiştir.



Şekil 4. 8. *Aphis gossypii* ile PPV-T taşıma denemelerinde kullanılan ve yapraklarında sarı mozaik lekeler ve küçülmeler gözlenen 2 nolu *Nicotiana benthamiana* tütün bitkisi



Şekil 4. 9. *Aphis gossypii* ile PPV-T taşıma denemelerinde kullanılan ve yaprak damar aralarında sararmalar, yapraklarında sarı mozaik lekeler ve küçülmeler gözlenen 8 nolu *Nicotiana benthamiana* tütün bitkisi



Şekil 4. 10. *Aphis gossypii* ile PPV-T yaşama denemelerinde kullanılan ve yaprak damarlarında renk açılmaları (solda) ve üst yapraklarda küçülmeler (sağda) gözlenen 5 nolu *Nicotiana benthamiana* tütün bitkisi

Altıncı hafta sonunda, taşıma denemesinde kullanılan 20 adet tütün bitkisine DAS- ELISA analizi yapılmıştır. Yapılan DAS- ELISA sonucunda yapraklarında sarı mozaik lekeler ve küçülmeler gözlenen 2 ve 8 nolu tütün bitkileri PPV bakımından pozitif bulunurken, diğer tüm bitkiler PPV bakımından negatif bulunmuştur. Bitkilere ayrıca viral RNA izolasyonu sonrasında gerçekleştirilen real-time RT-PCR analizleri yapılmıştır. DAS- ELISA analizinde PPV yönünden pozitif bulunan 2 ve 8 nolu *N. benthamiana* tütün bitkileri real-time RT-PCR analizinde de pozitif bulunmuş, DAS- ELISA analizinde PPV negatif bulunan 5 nolu örnek ise real-time RT-PCR analizinde PPV yönünden pozitif bulunmuştur (Şekil 4. 11 ve Şekil 4. 12). Diğer 17 tütün bitkisi PPV bakımından negatif bulunmuştur.

Sonuç olarak, *A. gossypii* ile KBY'ye göre yapılan deneysel taşıma denemelerinde, *A. gossypii* yaprak bitinin inokulum kaynağı tütün bitkisinden, indikatör *N. benthamiana* tütün bitkisine PPV-T'yi % 15.00 oranında taşıdığı tespit edilmiştir. Çağlayan ve ark. (2013), İzmir Menemen civarında yaptığı bir çalışmada *A. gossypii* yaprak bitinin kayısı ağaçlarında yaygın bulunduğunu ve bu yaprak bitinin PPV'yi % 23.80 oranlarında bünyesinde bulundurduğunu tespit etmişlerdir. Yine benzer bir çalışmada Kaya ve ark. (2014), Hatay'da şeftali bahçesinde *A. gossypii*'nin yaygın olarak bulunduğunu ve bu yaprak bitinin PPV'yi %12.42 oranlarında bünyesinde bulundurduğunu belirtmiş, *A. gossypii*'nin PPV'yi taşımada rol oynayabileceğini bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışma ile elde edilen bulgular, *A. gossypii* yaprak bitinin PPV-T'nin vektörü olduğunu ispatlamaktadır. Ayrıca bu çalışma KBY'ye göre kurulan deneysel taşıma denemelerinde *A. gossypii*'nin PPV taşımada başarısız olduğunu bildiren Labonne ve ark. (1995) ile farklılık göstermektedir.

140711_PPV-T_AG'MP'HP

Abs Quant/Fit Points for 140711_PPV-T_AG'MP'HP (Abs Quant/Fit Points)

Settings

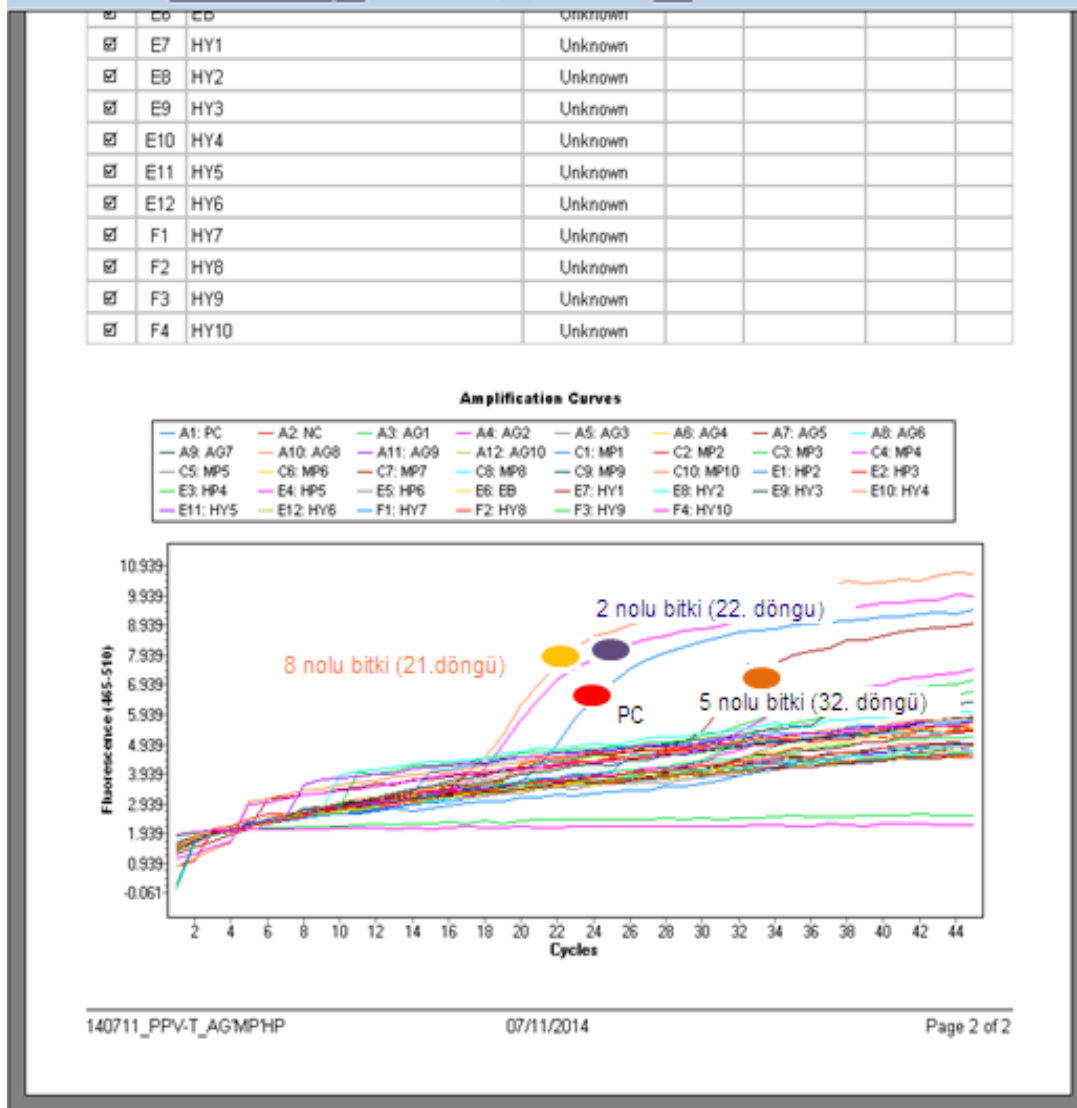
Channel	465-510						
Color Compensation	Off						
Standard Curve	Set Efficiency (2.00)						
Program	Cycling					Units	
First Cycle	1	Last Cycle	45	Background	2-6		
Noiseband Method	Noiseband (Fluor)	Noiseband	7.3286	STD Dev Multiplier	16.9503		
# of Fit Points	2	Threshold Method	Auto	Threshold	7.3286		

Subset Name 140711_PPV-T_AG'MP'HP

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
☒	A1	PC	Unknown	25.49			
☒	A2	NC	Unknown				
☒	A3	AG1	Unknown				
☒	A4	AG2	Unknown	22.33			
☒	A5	AG3	Unknown				
☒	A6	AG4	Unknown				
☒	A7	AG5	Unknown	32.70			
☒	A8	AG6	Unknown				
☒	A9	AG7	Unknown				
☒	A10	AG8	Unknown	21.47			
☒	A11	AG9	Unknown				
☒	A12	AG10	Unknown				
☒	C1	MP1	Unknown				
☒	C2	MP2	Unknown				
☒	C3	MP3	Unknown				
☒	C4	MP4	Unknown				
☒	C5	MP5	Unknown				
☒	C6	MP6	Unknown				
☒	C7	MP7	Unknown				
☒	C8	MP8	Unknown				

Şekil 4. 11. *Aphis gossypii* ile PPV-T taşıma denemelerinde kullanılan ve viral RNA izolasyonu sonrasında real-time RT-PCR ile PPV tespit edilen 2 (AG 2), 5 (AG 5) ve 8 (AG 8) nolu *Nicotiana benthamiana* tütün bitkilerinin real-time Roche 480 II cihaz verilerine göre analiz sonuç raporu. Buna göre 2 nolu bitki 22.33 CP'de, 5 nolu bitki 32.70 CP'de ve 8 nolu bitki ise 21.47 CP düzeyinde PPV pozitif bulunmuştur. CP: Crossing point (DNA çoğalmasının görünebilir olduğu ilk nokta); PC: Pozitif kontrol (PPV-M); NC: Negatif kontrol (Su kontrol); AG: *Aphis gossypii*



Şekil 4. 12. *Aphis gossypii* ile PPV-T taşıma denemelerinde kullanılan ve viral RNA izolasyonu sonrasında real-time RT-PCR ile PPV tespit edilen 2 (AG 2), 5 (AG 5) ve 8 (AG 8) nolu *Nicotiana benthamiana* tütün bitkilerinin real time Roche 480 II cihaz verilerine göre DNA amplifikasyon eğrisi. PC 25.döngüde, 2 nolu bitki 22.döngüde, 8 nolu bitki 21.döngüde ve 5 nolu bitki 32.döngüde PPV pozitif değer göstermiştir. PC: Pozitif kontrol; AG: *Aphis gossypii*

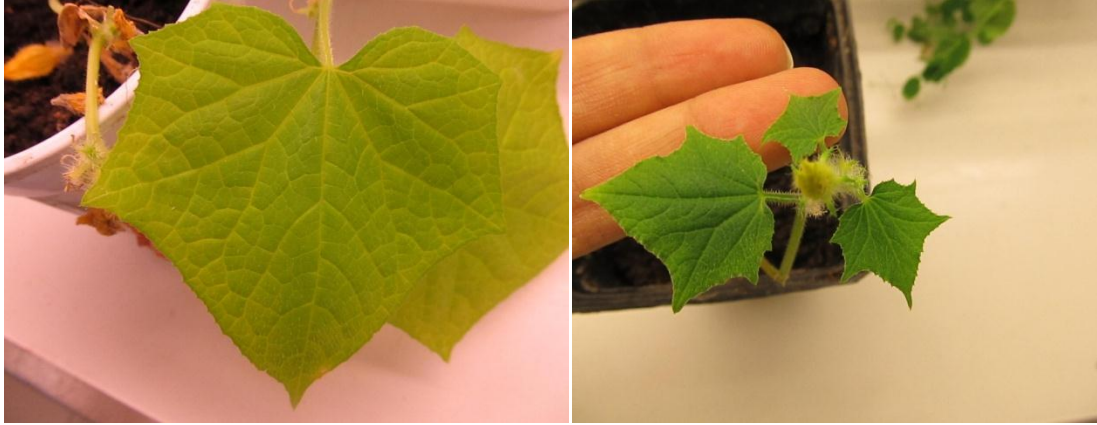
4.1.2.1.5. *Aphis gossypii* ile Hıyar (*Cucumis sativus*) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemesinin DAS-ELISA ve Real-time RT-PCR Analizleri

A. gossypii ile yapılan birçok taşıma denemesinde hıyar bitkisi üzerinde çoğaltılan yaprak bitleri kullanılmıştır. Denemeler esnasında yaprak bitinin, *P. sativum* ‘Siena’ bezelye bitkileri ve *N. benthamiana* tütün bitkileri üzerinde uzun süre beslenme

eğiliminde olmadıkları gözlenmiştir. Bu nedenle de *A. gossypii*'nin hıyar bitkisi üzerindeki davranışlarını gözlemlemek ve hıyar bitkisine PPV-T'yi daha etkin taşıyıp taşıyamadığını anlamak adına böyle bir deneme gerçekleştirilmiştir.

PPV-T'nin *A. gossypii* ile hıyar bitkisine KBY'ye göre gerçekleştirilen deneysel taşıma denemelerinde inokulum kaynağı olarak PPV-T enfekteli tütün bitkisi tercih edilmiş, indikatör sağlıklı bitki olarak da 20 adet hıyar bitkisi kullanılmıştır. Ayrıca denemelerde, hıyar bitkisi üzerinde çoğaltılan *A. gossypii* yaprak bitleri kullanılmıştır.

PPV-T'nin *A.gossypii* ile deneysel taşıma denemesinde kullanılan hıyar bitkileri 4- 5 hafta süresince iklim odasında simptomolojik olarak gözlenmiştir. Yapılan simptomolojik gözlem süresince hıyar bitkilerinden 8 tanesi ölmüş, kalan bitkilerin de yapraklarında küçülme ve gelişme geriliği gözlenmiştir; ancak PPV-T'ye özgün bir simptomolojik değişim gözlenmemiştir (Şekil 4. 13).



Şekil 4. 13. Sağlıklı hıyar (*Cucumis sativus*) bitkisinin normal büyüklükteki yaprağı (solda) ve *Aphis gossypii* ile deneysel taşıma denemelerinde kullanılan hıyar bitkisinin yapraklarındaki küçülmeler ve gelişme geriliği (sağda)

Bitkilere beşinci hafta sonunda DAS- ELISA ve real-time RT-PCR analizleri yapılmıştır. Yapılan DAS-ELISA ve doğrudan viral RNA izolasyonu sonrası gerçekleştirilen real-time RT-PCR analizlerinde tüm örnekler PPV yönünden negatif bulunmuştur.

Elde edilen sonuçlara göre, PPV-T'nin *A.gossypii* ile deneysel taşıma etkinliğinin sadece yaprak bitinin beslenmeyi tercih ettiği konukçu bitkiye bağlı olmadığını, taşınma koşullarında yaprak bitinin beslenme esnasında PPV'yi bünyesine alıp

alamadığının daha etkin olduğunun, ayrıca yapılan diğer çalışmalara bakıldığında yaprak bitinin taşıma etkinliğinde PPV'nin ırkının da büyük rol oynadığının dikkate alınması gerektiği anlaşılmıştır. Bu çalışma *A. gossypii* ile KBY'ye göre yapılan denemelerde PPV'nin taşınmadığını bildiren Labonne ve ark. (1995) ile paralellik gösterirken, *A. gossypii*'nin PPV'yi taşıyan vektör yaprak biti olduğunu bildiren Avinent ve ark. (1991) ile farklılık göstermektedir.

4.1.2.1.6. *Hyalopterus pruni* ile Myrobalan 29C (*Prunus cerasifera*) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemelerinin DAS-ELISA ve Real-time RT-PCR Analizleri

H. pruni ile Myrobalan 29C bitkisine deneysel PPV-T taşıma denemesinde, indikatör sağlıklı bitki olarak 6 adet Myrobalan 29C bitkisi kullanılmıştır. Denemelerde inokulum kaynağı olarak da PPV-T Ankara izolatu ile enfekteli Myrobalan 29C bitkisi kullanılmıştır. Taşıma denemesinde kullanılan *H. pruni* yaprak bitlerinin denemeye dahil edilmeden önce, yapılan spot real time RT-PCR analizlerinde PPV yönünden negatif olduğu tespit edilmiştir. PPV-T taşıma denemesi sonunda, indikatör Myrobalan bitkileri 8- 12 haftalık simptomolojik gözleme alınmıştır. Simptomolojik gözlem süresince bitkilerde herhangi bir viral simptom tespit edilmemiştir. Gözlem süresi sonunda bitkilerden alınan yaprak örneklerine doğrudan viral RNA izolasyonu ile gerçekleştirilen real-time RT-PCR analizi yapılmıştır. Yapılan analizlerde tüm bitkiler PPV yönünden negatif bulunmuştur. Ancak PPV'nin çok yıllık bitkilerde, bitkilerin soğuklama ihtiyacını takip eden dönemde de ortaya çıkabileceği göz önünde bulundurulduğundan, bitkilerin 2- 3 aylık soğuklama ihtiyacı giderilmiştir. Daha sonra bitkilerin tekrardan sürgün vermesi sağlanmıştır. Yeni yapraklanma süresinde 6 adet Myrobalandan 29C bitkisinden 1 tanesinde hiçbir şekilde yeni sürgün oluşmadığı ve bu bitkinin kuruyarak öldüğü gözlenmiştir. Bitkideki bu kurumunun, soğuklama süresince bitkinin zayıf düşmesini sağlayabilecek PPV'nin var olma ihtimalinden mi, fizyolojik nedenlerden mi kaynaklandığı bilinmemektedir. Geriye kalan 5 adet Myrobalan 29C bitkisinde taze yaprak sürgünleri oluşmuştur. Myrobalan 29C bitkileri 2 aylık yapraklanma periyodu süresince simptomolojik değişim bakımından takip edilmiş, yeni süren yapraklarda PPV'ye ilişkin herhangi bir simptom gözlenmemiştir. Yapraklardan alınan örneklerle DAS- ELISA analizi ve doğrudan viral RNA izolasyonu sonrası

gerçekleştirilen real-time RT- PCR analizi yapılmıştır. Yapılan her iki analizin sonucuna göre 5 adet indikatör Myrobalan bitkisinin tamamı PPV açısından negatif bulunmuştur.

Sonuç olarak, KBY'ye göre kurulan deneysel taşıma denemesinde 5 adet Myrobalan 29C bitkisine yapılan analizlerde *H. pruni*'nin PPV-T'yi taşımadığı tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışma, *Prunus*'dan *Prunus*'a PPV'nin deneysel taşıma denemesinde *H. pruni*'nin PPV'yi taşıdığını bildiren Avinent ve ark. (1993) ile farklılık gösterirken, *Prunus*'dan *Prunus*'a *H. pruni*'nin PPV'yi taşımadığını bildiren Labonne ve ark. (1995) ile benzer sonuçlara sahiptir. Elibüyük (2003), Ankara'da *H. pruni*'nin kayısı ve erik yetiştiriciliğinin yoğun yapıldığı bahçelerde yaygın olduğunu belirtmiş ve bu yaprak bitinin PPV'yi taşıdığını bildirmişlerdir. Çağlayan ve ark. (2013), *H. pruni*'nin Ege Bölgesi'nde PPV-T enfekteli kayısı bahçesinde yaygın bulunan yaprak biti olduğunu ve *H. pruni*'nin PPV'yi % 32.50 oranlarında bünyesinde bulundurduğunu bildirmişlerdir. Benzer bir çalışmada, Kaya ve ark. (2014), Hatay'da PPV-M enfekteli şeftali bahçesinde *H. pruni*'nin yaygın bulunan yaprak biti olduğunu ve *H. pruni*'nin PPV'yi % 11.11 oranlarında bünyesinde bulundurduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada elde edilen bulgular, Türkiye'de yapılan bazı çalışmaları (Elibüyük, 2003; Çağlayan ve ark., 2013; Kaya ve ark., 2014) desteklememektedir. Ayrıca bu çalışmada elde edilen bulgular, sert çekirdekli meyve ağaçlarının 20'den fazla yaprak bitine konukçuluk etmesine rağmen, yaprak bitlerinin bu ağaçlarda kolonize olmasının *Prunus*'un türüne bağlı olduğunu ve PPV'nin bu yaprak bitleri ile yayılmasının PPV'nin ırkına bağlı olduğunu bildiren Labonne ve Dallot (2006) ile, *H. pruni*'nin PPV'yi taşımadığını bildiren Büchen-Osmond (2006) ile ve virölüfer yaprak bitlerinin PPV'yi taşımada etkin olmamasının Myrobalan 29C gibi bazı *Prunus* anaçlarının PPV'ye dayanıklılık göstermesinden kaynaklanabileceğini bildiren Vidal ve ark. (2010) ile benzerlik göstermektedir.

4.1.2.2. ‘Serbest Beslenme Yöntemi’ (SBY) ile Deneysel Taşıma Denemeleri

4.1.2.2.1. *Myzus persicae* ile Tütün (*Nicotiana benthamiana*) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemelerinin DAS-ELISA ve Real-time RT-PCR Analizleri

PPV-T’nin, *M. persicae* ile *N. benthamiana* tütün bitkisine deneysel taşıma denemelerinde iki farklı SBY’ye göre deneysel taşıma denemesi yürütülmüştür.

Yapılan ilk deneysel taşıma denemesinde indikatör bitki olarak 7 adet *N. benthamiana* tütün bitkileri kullanılmıştır. Denemede, PPV-T enfekteli kayısı bitkilerinin yoğun olarak PPV semptomu gösteren yaprakları inokulum kaynağı olarak kullanılmıştır. Enfekteli kayısı yaprakları üzerine aktarılan *M. persicae* yaprak bitleri, enfekteli yaprakla beraber doğrudan indikatör tütün bitkileri üzerine konulmuş ve tül kafes içerisinde serbest bir şekilde 5 gün boyunca beslenmesi sağlanmıştır. Taşıma denemelerinden üç hafta sonrasında 7 adet indikatör *N. benthamiana* tütün bitkisinden bir tanesinde (6 nolu bitki) yaprak damarlarında bant şeklinde koyulaşmalar ve damar aralarında mozaik semptomlar gözlenmiştir (Şekil 4. 14).



Şekil 4. 14. *Myzus persicae* ile PPV-T deneysel taşıma denmelerinde kullanılan ve yaprak damarlarında bant şeklinde koyulaşmalar ve damar aralarında mozaik symptom gözlenen 6 nolu *Nicotiana benthamiana* tütün bitkisi

N. benthamiana tütün bitkilerinden alınan yaprak örneklerine yapılan DAS-ELISA ve viral RNA izolasyonu sonrasında gerçekleştirilen real-time RT-PCR analizlerinde symptom gösteren 6 nolu tütün bitkisi PPV yönünden pozitif bulunurken diğer tütün bitkileri negatif bulunmuştur (Şekil 4. 15; Şekil 4. 16).



LightCycler® 480 Software

Report



140516_PPV-MP-K

Abs Quant/Fit Points for 140516_PPV_MP_K (Abs Quant/Fit Points)

Settings

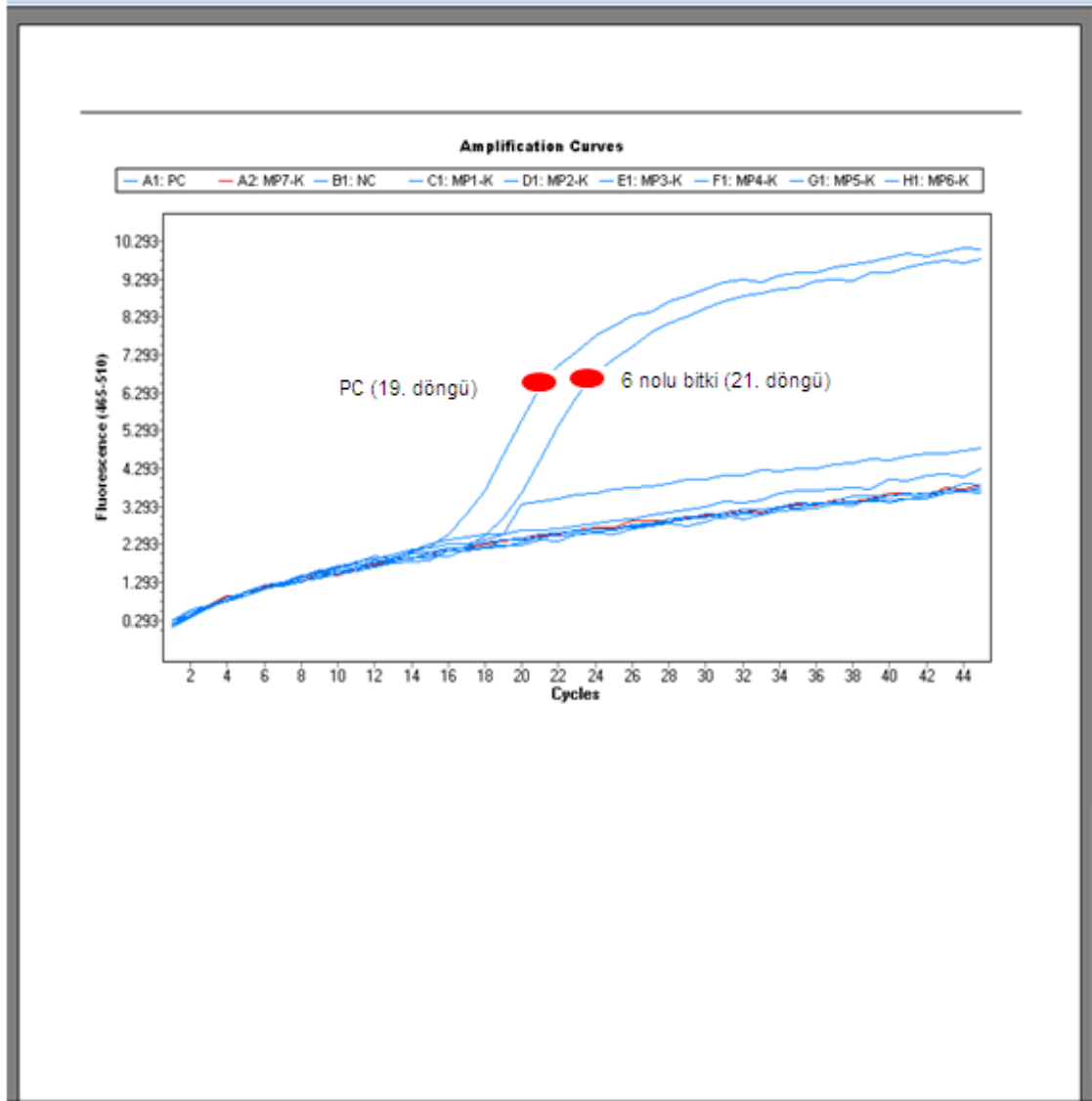
Channel	465-510		
Color Compensation	Off		
Standard Curve	Set Efficiency (2.00)		
Program	Cycling	Units	
First Cycle	1	Last Cycle	45
		Background	2-6
Noiseband Method	Noiseband (Fluor)	Noiseband	5.2776
		STD Dev Multiplier	17.3731
# of Fit Points	2	Threshold Method	Auto
		Threshold	5.2776

Subset Name 140516_PPV_MP_K

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
☒	A1	PC	Unknown	19.62			
☒	A2	MP7-K	Unknown				
☒	B1	NC	Unknown				
☒	C1	MP1-K	Unknown				
☒	D1	MP2-K	Unknown				
☒	E1	MP3-K	Unknown				
☒	F1	MP4-K	Unknown				
☒	G1	MP5-K	Unknown				
☒	H1	MP6-K	Unknown	21.82			

Şekil 4. 15. Viral RNA izolasyonu sonrasında real-time RT-PCR ile PPV tespit edilen 6 nolu (MP6- K) tütün bitkisinin real-time Roche 480 II cihaz verilerine göre analiz sonuç raporu. 6 nolu bitki 21.82 CP düzeyinde PPV pozitif bulunmuştur. CP: Crossing point (DNA çoğalmasının görünebilir olduğu ilk nokta) PC: Pozitif kontrol (PPV-M); NC: Negatif kontrol (Su kontrol); MP: *Myzus persicae*



Şekil 4. 16. Viral RNA izolasyonu sonrasında real-time RT-PCR ile PPV tespit edilen tütün bitkisinin (MP6-K) ve pozitif kontrolün real-time Roche 480 II cihaz verilerine göre DNA amplifikasyon eğrisi. Buna göre, PC 19. döngüde, 6 nolu bitki 21. döngüde PPV pozitif sonuç vermiştir. MP: *Myzus persicae*; PC: Pozitif kontrol

SBY ile kurulan ikinci deneysel taşıma denemesinde indikatör bitki olarak 8 adet *N. benthamiana* tütün bitkisi kullanılmıştır. Denemede PPV-T enfekteli tütün bitkisi inokulum kaynağı olarak kullanılmıştır. 20 gün süresince yaprak bitlerinin enfekteli bitkiden diğer bitkilere serbest geçişi ve beslenmesi sağlanmıştır. Deneme sonunda tütün bitkileri 3 haftalık simptomolojik gözleme alınmıştır. Simptomolojik gözlem sonunda 8 adet indikatör tütün bitkisinden 3, 4, 6 nolu bitkilerin yapraklarında viral hastalık benzeri değişiklikler gözlenmiştir (Şekil 4. 17).



Şekil 4. 17. *Myzus persicae* ile PPV-T deneysel taşıma denemelerinde kullanılan ve yapraklarında renk açılmaları ve yaprak uçlarında kıvrılmalar gözlenen 3, 4, 6 nolu *Nicotiana benthamiana* tütün bitkileri

8 adet indikatör tütün bitkisine yapılan DAS-ELISA ve viral RNA izolasyonu sonrasında real-time RT-PCR analizi sonucunda, yapraklarında simptom gözlenen 6 nolu bitki PPV yönünden pozitif bulunurken, diğer tütün bitkileri negatif bulunmuştur (Şekil 4. 13; Şekil 4. 14). 3 ve 4 nolu bitkilerin yapraklarında virüs simptomu benzeri mozaik lekeler ve renk açılmaları gözlenmesine rağmen DAS-ELISA ve real-time RT-PCR analizlerinde PPV yönünden negatif sonuç vermesinin bitkilerde besin elementi eksikliğine veya stres koşullarına bağlı olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak SBY ile gerçekleştirilen iki farklı denemede, *M. persicae* yaprak biti PPV-T'yi indikatör *N. benthamiana* tütün bitkisine sırasıyla % 14.29 ve % 12.50 oranlarında taşımıştır. Elde edilen bu sonuçlar, Labonne ve ark. (1995)'nin SBY ile gerçekleştirdikleri deneysel taşıma denemesi ile benzerdir. Ayrıca bu çalışma ülkemizde sert çekirdekli meyve yetiştiriciliğinin yapıldığı alanlarda *M. persicae*'nin yaygın bulunduğu ve yaprak bitinin PPV'nin yayılmasında vektör olabileceğini bildiren çalışmaları (Çağlayan ve ark., 2013; Kaya ve ar., 2014) da desteklemektedir.



LightCycler® 480 Software

Report



140723_PPV-T_MP_son

Abs Quant/Fit Points for 140723_PPV-T_MPson (Abs Quant/Fit Points)

Settings

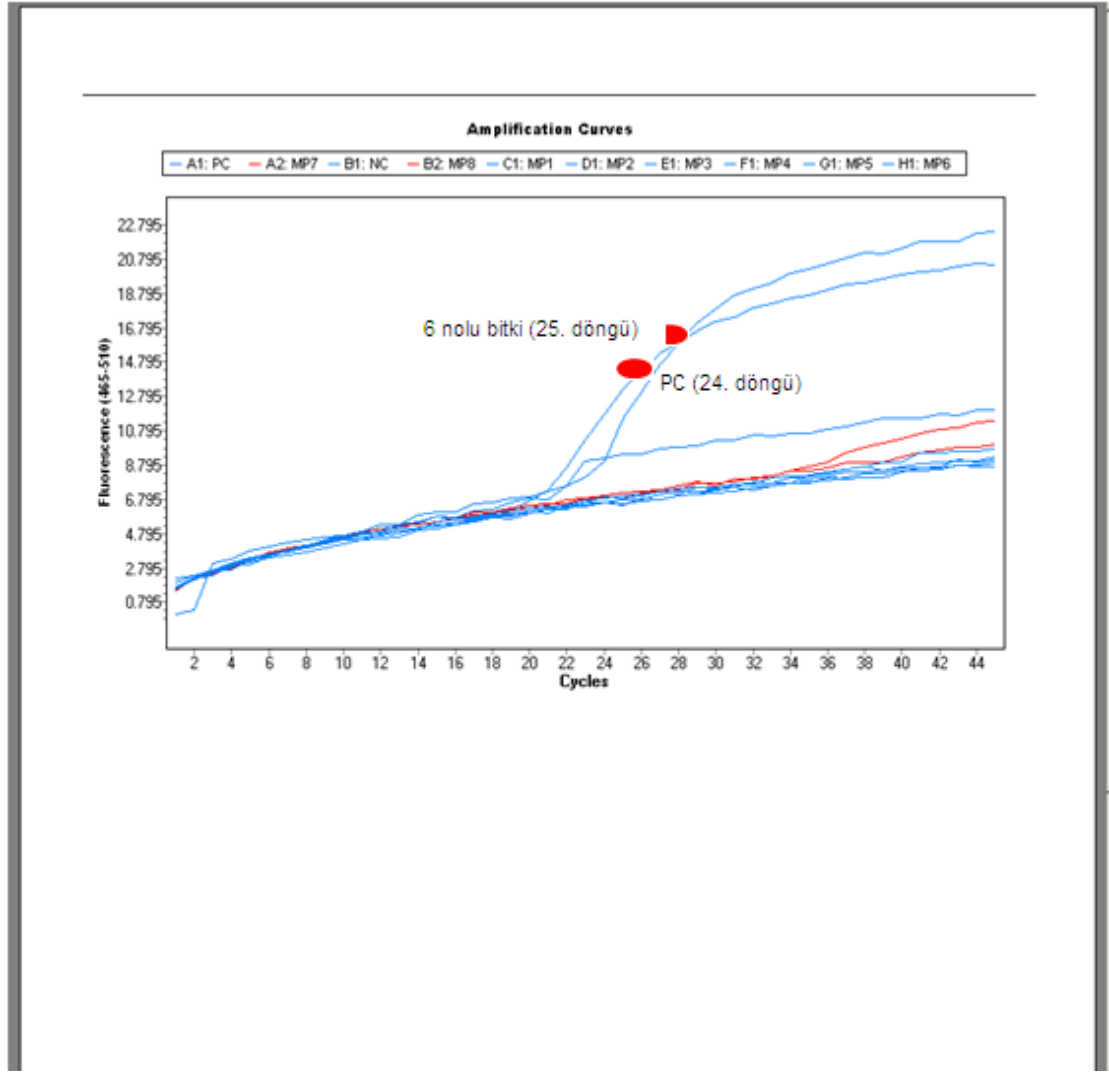
Channel	465-510				
Color Compensation	Off				
Standard Curve	Set Efficiency (2.00)				
Program	Cycling				Units
First Cycle	1	Last Cycle	45	Background	2-6
Noiseband Method	Noiseband (Fluor)	Noiseband	12.3924	STD Dev Multiplier	15.0538
# of Fit Points	2	Threshold Method	Auto	Threshold	12.3924

Subset Name	140723_PPV-T_MPson
-------------	--------------------

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
☒	A1	PC	Unknown	24.15			
☒	A2	MP7	Unknown				
☒	B1	NC	Unknown				
☒	B2	MP8	Unknown				
☒	C1	MP1	Unknown				
☒	D1	MP2	Unknown				
☒	E1	MP3	Unknown				
☒	F1	MP4	Unknown				
☒	G1	MP5	Unknown				
☒	H1	MP6	Unknown	25.53			

Şekil 4. 18. Viral RNA izolasyonu sonrasında real-time RT-PCR ile PPV tespit edilen 6 nolu (MP6) *Nicotiana benthamiana* tütün bitkisinin real-time Roche 480 II cihaz verilerine göre analiz sonuç raporu. Buna göre, PC 24.15 CP'de, 6 nolu bitki 25.53 CP'de pozitif sonuç vermiştir. CP: Crossing point (DNA çoğalmasının görünebilir olduğu ilk nokta); PC: Pozitif kontrol (PPV-T); NC: Negatif kontrol (Su kontrol); MP: *Myzus persicae*



Şekil 4. 19. Viral RNA izolasyonu sonrasında real-time RT-PCR ile PPV tespit edilen tütün bitkisinin (MP6) ve pozitif kontrolün real time Roche 480 II cihaz verilerine göre DNA amplifikasyon eğrisi. Buna göre, PC 24.döngüde, 6 nolu bitki 25.döngüde PPV pozitif sonuç vermiştir. MP: *Myzus persicae*; PC: Pozitif kontrol

4.1.2.2.2. *Aphis gossypii* ile Tütün (*Nicotiana benthamiana*) Bitkisine Deneysel Taşıma Denemelerinin DAS-ELISA ve Real-time RT-PCR Analizleri

A. gossypii yaprak biti ile kurulan deneysel taşıma denemesinde indikatör bitki olarak 10 adet *N. benthamiana* tütün bitkisi, inokulum kaynağı olarak da PPV-T ile enfekteli tütün bitkisi kullanılmıştır. Denemede, birkaç günlük takip sonucunda yaprak bitlerinin öldüğü gözlemlenmiş ve deneme sonlandırılmıştır. Taşıma denemelerinde kullanılan *A. gossypii* yaprak biti konukçu bitki olarak hıyar bitkisi üzerinde saf kültür

olarak çoğaltılmış ve burada kolonize olmuştur. *A. gossypii* yaprak bitinin farklı konukçu bitkilerinde farklı morfolojik eğilim gösterebildiği ve değişik beslenme davranışı izlediği Margaritopoulos ve ark. (2006) tarafından bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada, hıyar bitkisine adapte olmuş olan *A. gossypii* yaprak bitinin *N. benthamiana* tütün bitkisinde uzun süreli beslenmediği gözlemlenmiştir. Bu bulgu, Margaritopoulos ve ark. (2006)'nın yaptığı çalışmayı destekler nitelikte olmasına rağmen, Labonne ve ark. (1995)'nin *A. gossypii*'nin SBY ile PPV'yi taşıdığını bildirdiği çalışmasıyla farklılık göstermektedir.

4.2. 'Melez Kayısı Bitkilerinde PPV'ye Dayanıklılığın Moleküler Markörlerle Araştırılması'

4.2.1. Melez Bitkilerden DNA İzolasyonları

Malatya İnönü Üniversitesi Kayısı Araştırma Enstitüsü'nde PPV'ye dayanıklılık kazandırılmak üzere açık arazide melezlenen SEO ve yerli kayısı çeşitlerinin (Hacıhaliloğlu, Çöloğlu, Adilcevaz5, Şekerpare, Çataloğlu) melezlerinin PPV dayanıklılık allellerini taşıyıp taşımadığını tespit için yapılan çalışmalarda küçük değişikliklerle CTAB yöntemiyle (Doyle ve Doyle, 1987) toplam 530 melezin DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Melez bitkilerin dayanıklılık allelini taşıyıp taşımadığını araştırmak için yapılan çalışmalarda, DNA izolasyonu gerçekleştirilen 530 adet melez bitkiden pomolojik olarak daha iyi olabileceği düşünülen 134 adet melezin DNA'sı fragment analizlerinde kullanılmıştır.

4.2.2. Melez Bitkilerin PCR ve Kapillar Elektrophorez Analizleri

Şarkaya dayanıklı kayısı hatlarının seçiminde Soriano ve ark. (2012) tarafından PGS1.21 ve PGS1.23 olarak isimlendirilmiş olan SSR primerleri kullanılmıştır. PCR analizleri, Schuelke (2000) tarafından bildirildiği şekilde FAM ile işaretlenmiş M13 primeri kullanılarak fragment analizine hazırlanmıştır. PCR ürünleri, öncelikle agaroz jel elektrophorez ile analiz edilmiştir. Amplifikasyonu gerçekleşen ve DNA kalitesi iyi

olan PCR ürünlerinin daha sonra kapillar elektroforez yöntemi ile ABI 3500xL Sequance Analyzer cihazında fragment analizi gerçekleştirilmiştir. Fragment analizi yapılan toplam 134 adet melez bitkinin, GeneMapper software 4.0 ile yorumlanması sonucunda PPVres lokusuna yakın bölgeleri içeren PGS1.21 ve PGS1.23 SSR primerlerinin 47 adet melez bitki DNA'sında çoğalma gerçekleştirdiği ve bu 47 adet melezin PPV'ye dayanıklılık allelini taşıdığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Ayrıca çalışma kapsamında, SEO ve yerli çeşitlerden farklı ebeveynlerin (ana-baba) kullanılmasıyla gerçekleştirilen melezlemelerden elde edilen yavru melezlerde de ebeveyn farkı olmaksızın dayanıklılık allelinin yavruya aktarıldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4. 1). Bu sonuçlar, Goldrich'le 2 F1 soyu ve Lito ile 2 F2 soyu'nun dayanıklılık farklılıklarını analiz etmiş olan Soriano ve ark. (2009) çalışması ile benzerlikler içermektedir.

Dünya'da PPV'ye dayanıklılığın geliştirilmesi konusunda benzer çalışmalar yapılmıştır. Soriana ve ark. (2012), yapılan çalışmanın MAS için standardize edilmesi amacıyla, haritalama için hem SEO hem de Goldrich kökenli melezlerde polimorfik olan sadece 7 SSR (PGS1.03, PGS1.20, PGS1.21, PGS1.23, PGS1.24, PGS1.252 ve 96P10_SP6) primerleri seçmiş ve bu SSR'lerin PPVres lokusu ile bağlantılı olduklarını kanıtlanmışlardır. Ayrıca, geliştirilen SSR markörlerinin PPVres ile ilgili dayanıklılık genleri bölgesinde olduğunu ve test edilen bütün dayanıklılık kaynaklarında ortak olduğunu düşündüğünden söz konusu markörlerin, bütün dayanıklı çeşitlerin döllerinde de MAS için uygun olabileceğini bildirmiştir. Gürçan ve Yılmaz (2012), bugüne kadar *Prunus* türlerine özgü 360'ın üzerinde SSR geliştirildiğini, bunların birçoğunun dayanıklılık genini bulmak için yapılan kayısı genetik haritalarında kullanıldığını bildirmiştir. Balazs ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada 5 SSR markörü (Aprigms 18; Aprigms 24;ssrPACITA5; ssrPACITA17; EP5100) hassas ve dayanıklı kayısı çeşitlerini testlemede kullanmış, kullanılan beş markörden üçünün (ssrPACITA5; ssrPACITA17; EP5100) PPV dayanıklı çeşitlerin seleksiyonu için uygun olduğunu bildirmiştir. Decroocq ve ark. (2013), PPV'ye dayanıklılık ile ilgili bu güne kadar yapılan birçok çalışmada Goldrich, Harcot, SEO, Lito, Harlayne, Stella, OrangeRed, NJA2 kayısı çeşitlerinin doğal olarak PPV dayanıklılık genini taşıdığını bildirmiştir. Ayrıca ülkemiz kayısı çeşitleriyle yapılan benzer çalışmalarda, Dosba ve ark. (1992) Çöloğlu, Hacıhaliloğlu, Hasanbey, Karacabey ve Tokaloğlu çeşitleri PPV-M

ve PPV-D ırklarına hassas olduğu bildirilmiştir. Ulubaş Serçe ve ark. (2013b), bazı yerli kayısı çeşitlerinde PGS1.21 ve PGS1.23 moleküler markörleri kullanılarak PPV dayanıklılığını araştırmıştır. Çalışma kapsamında, Hacıhaliloğlu, Kabaası, Hasanbey, Çöloğlu, Adilcevaz5, şekerpare, Mahmudun Eriği ve Çataloğlu gibi yerli kayısı çeşitlerini içeren toplam 180 kayısı progenisi taranmış, markörlerle taranan hiçbir yerli kayısı çeşinde PPV dayanıklılığını teşvik eden allele rastlanmadığı bildirilmiştir.

Dünyada ve Türkiye’de PPV’ye dayanıklılık konusunda yapılan tüm araştırmalar ışığında gerçekleştirilen bu çalışmada elde edilen veriler, Ulubaş Serçe ve ark. (2013b) tarafından yerli kayısı çeşitlerinin PPV’ye doğal olarak dayanıklılık allelini taşımadığını bildirdiği çalışması ile benzer, Soriano ve ark. (2012)’ın belirlemiş olduğu SSR markörlerinin SEO kaynaklı tüm melezlemelerin döllerinde de aynı sonucu verebileceğini belirttikleri çalışmasını da destekler niteliktedir.

4.1. Fragment analizi yapılan toplam melez bitki sayısı ve PPV’ye dayanıklılık alleli içerdđi tespit edilen melez bitkilerin sayıları (%)

Melezler	Fragment analizi yapılan melezlerin numaraları	PPV dayanıklılık alleli tespit edilen melezlerin numaraları	Dayanıklılık alleli tespit edilen melez sayısı/ toplam test edilen bitki sayısı	Dayanıklılık alleli tespit edilen melez sayısı (%)
Hacıhaliloğlu X SEO	44, 61, 82, 22, 28, 34, 63, 68, 70, 76, 82	44, 63, 70, 76	4/11	36.36
Çöloğlu X SEO	03, 20, 21, 60, 63, 06, 18, 29, 45, 62	03, 18, 29, 60, 63	5/10	50.00
Adilcevaz 5 X SEO	02, 29, 32, 38, 39, 49, 52, 55, 59, 21, 30, 36, 63, 74	30, 49, 52, 74	4/14	28.57
şekerpare X SEO	01, 03, 04, 08, 12, 13, 14, 22, 32, 36, 40, 44, 47, 50, 52	04, 12, 32, 36, 40, 44, 52	7/15	46.67

4.1. (Devam) Fragment analizi yapılan toplam melez bitki sayısı ve PPV'ye dayanıklılık alleli içerdği tespit edilen melez bitkilerin sayıları (%)

SEO X Adilcevaz5	08,22, 38, 47, 69, 71, 29, 32, 58, 61, 62, 82, 86, 93, 99, 102, 106, 107, 111, 176	29, 32, 58, 69, 93, 99, 107, 111	8/20	40.00
SEO X Çataloğlu	05, 33, 49, 65, 66, 82, 90, 106, 118, 124, 125, 131, 134, 141, 146, 147, 01, 09, 15, 31, 34, 35, 36, 38, 42, 55, 58, 63, 126, 127, 129, 135, 46	03, 31, 42, 63, 118, 127, 134, 147	8/33	24.24
SEO X Hacıhaliloğlu	2, 16, 23, 32, 02, 51, 52, 60, 71	16, 51, 71	3/9	33.33
SEO X Şekerpare	21, 39, 67, 74, 02, 03, 12, 15, 27, 28, 29, 34, 35, 40, 43, 46, 50, 59, 61, 63, 71, 76	12, 21, 28, 39, 40, 50, 61, 63	8/22	36.36
Toplam	134	47	47	35.07

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan bu çalışma ‘*Plum pox virus* (PPV) T ırkının bazı biyolojik özelliklerinin belirlenmesi’ ve ‘melez kayısı bitkilerinde PPV’ye dayanıklılığın moleküler markörlerle araştırılması’ olmak üzere iki ana başlık içermektedir.

‘*Plum pox virus* (PPV) T ırkının bazı biyolojik özelliklerinin belirlenmesi’ çalışmalarında, PPV-T’yi taşıdığı bilinen *M. persicae* ve *A. gossypii* yaprak bitleri (Avinent ve ark., 1991; Labonne ve ark., 1995) ile PPV’yi bazı kaynaklara göre taşıdığı (Lupoli ve ark., 1992) bazı kaynaklara göre ise taşımadığı (Büchen-Osmond, 2006) düşünülen ancak kayısı ağaçlarında yoğun olarak bulunan *H. pruni* (Çağlayan ve ark., 2013; Kaya ve ark., 2014) yaprak bitleri ile PPV-T’nin otsu ve odunsu konukçularına KBY ve SBY olmak üzere iki farklı deneysel taşıma denemeleri gerçekleştirilmiştir.

KBY ile PPV-T deneysel taşıma denemelerinde kullanılan yaprak bitleri, deneme sonuçları ve denemelere dair öneriler aşağıdaki gibi sıralanmıştır.

1. *M. persicae* ile ‘Colmo’ bezelyeleri, ‘Siena’ bezelyeleri ve *N. benthamiana* tütün bitkisine gerçekleştirilen taşıma denemelerinde, *M. persicae*’nin adı geçen bitkilere PPV-T’yi sırasıyla % 21.60, % 0 ve % 25.40 oralarında taşıdığı tespit edilmiştir (Çizelge 5. 1). Elde edilen bu veriler ışığında, *M. persicae* ile deneysel taşıma denemelerinde ‘Colmo’ bezelyelerinin ve *N. benthamiana* tütün bitkilerinin PPV-T ile yapılacak olan araştırmalarda indikatör bitki olarak güvenle kullanılabileceği söylenebilir. Ayrıca bu bitkilerin denemeler esnasındaki simptomolojik görünümünden ve yapılan analizleri desteklemesi bakımından PPV-T’ye oldukça hasas olduğunu da vurgulamak gerekir. Ayrıca denemeler süresince elde edilen sonuçların inokulum kaynağına, çevresel koşullara, yaprak bitlerinin aktarılmasında gösterilen dikkate ve deneyime bağlı olduğunu belirtmek gerekir. Denemelerde kullanılan *N. benthamiana* tütün bitkisinin, çevresel faktörlerden kaynaklı olarak yapraklarında belirtilen belirtiler gözlemlenebileceğinin dikkate alınması gerektiği, tek başına simptomolojik gözlemin yeterli olmayacağı, mutlaka ELISA ve PCR temelli analizlerin yapılarak sonuçların teyit edilmesi gerektiği tespit edilmiştir. ‘Colmo’ bezelyeleri kısa sürede yetişmesine rağmen ticari bir çeşit olmadığından elde edilmesi kolay

olmayan bir bitkidir. *N. benthamiana* tütün bitkilerinin de testleme aşamasına gelene kadar 4-6 hafta gibi bir süre almaktadır. Tüm bu bulgular göz önünde bulundurularak, yapılacak çalışmalara kısa sürede yetişen temini kolay ve en önemlisi PPV'ye hassas olduğu bilinen çeşitlerin dâhil edilmesi tavsiye edilmektedir.

2. *A. gossypii* ile 'Colmo' bezelyeleri, 'Siena' bezelyeleri, *N. benthamiana* tütün bitkisi ve hıyar bitkisine gerçekleştirilen taşıma denemelerinde, *A. gossypii*'nin PPV-T'yi her iki bezelye bitkisine % 0, tütün bitkisine %15.00 ve hıyar bitkisine % 0 oranlarında taşıdığı tespit edilmiştir (Çizelge 5. 1). Bu sonuçlara göre, PPV-T'nin *A. gossypii* ile deneysel taşıma denemelerinde tek ve en iyi sonucu *N. benthamiana* tütün bitkisinin verdiğini belirtmek gerekir. PPV-T'nin *A. gossypii* yaprak biti ile taşınmasını içeren çalışmalarda *N. benthamiana* tütün bitkisinin kullanımı önerilmektedir.

3. *H. pruni* ile PPV-T'nin Myrobalan 29C bitkisine gerçekleştirilen taşıma denemelerinde, iki yıl süresince simptomolojik gözlem yapılmıştır. Yapılan DAS-ELISA ve real-time RT-PCR analizlerinde *H. pruni* yaprak bitinin PPV'yi taşımadığı tespit edilmiştir. Taşıma denemesinde indikatör olarak tercih edilen bitkisinin de bu sonucu etkilediği düşünülmektedir. Ancak, bu çalışma ile *H. pruni*'nin PPV-T'nin vektörü olmadığını söylemek yerine PPV-T'yi taşıma etkinliğinin zayıf olduğunu belirtmek daha doğru olur. Buna göre, *H. pruni* yaprak bitinin PPV-T'nin birden fazla izolatu kullanılarak ve denemelerde PPV'ye daha hassas olan *Prunus* türleri kullanılarak daha geniş ve kapsamlı deneysel taşıma çalışmalarıyla PPV-T'yi taşıma etkinliğinin kesinlik kazandırılması önerilmektedir.

SBY ile PPV-T deneysel taşıma denemelerinde kullanılan yaprak bitleri, deneme sonuçları ve denemelere dair öneriler aşağıdaki gibi sıralanmıştır.

1. *M. persicae* ile *N. benthamiana* tütün bitkisine gerçekleştirilen taşıma denemelerinde, PPV-T kayısı yaprağı kullanarak ve enfekteli tütün bitkisi kullanarak gerçekleştirilen deneysel taşıma denemelerinde, *M. persicae* yaprak bitinin PPV-T'yi sırasıyla % 14.29 ve % 12.50 oranlarında taşıdığı tespit edilmiştir (Çizelge 5. 1). Doğrudan kayısı yaprağı kullanarak yapılan denemenin daha başarılı ve daha pratik olduğunu söylemek gerekir.

2. *A. gossypii* ile *N. benthamiana* tütün bitkisine taşıma denemelerinde, *A. gossypii*'nin tütün bitkisinde uzun süreli beslenmemesinden dolayı deneme sonlandırılmıştır. Bu durum göstermektedir ki, *A. gossypii* çoğaltıldığı konukçusundan başka bir bitkiye adaptasyonu kolay olan bir yaprak biti değildir. *A. gossypii*'nin bu beslenme davranışının yapılan çalışmalarda virüsü taşıma oranını etkilediği düşünülmektedir. *A. gossypii* ile yapılması düşünülen çalışmalarda eğer konukçusu olan indikatör bitki kullanılacaksa yaprak bitinin de aynı tür bitki üzerinde çoğaltılması önerilmektedir.

PPV-T'nin bazı biyolojik özelliklerinin araştırılması çalışmalarında gerçekleştirilen KBY ve SBY'yi kıyaslamak gerekirse;

- KBY'nin yaprak bitleri bakımından daha fazla deneyim gerektirdiği, ancak SBY'de yaprak bitinin kendiliğinden sağlıklı bitkilere geçmesi beklendiğinden böyle bir deneyime ihtiyaç olmadığının,
- KBY'de inokulum kaynağında yaprak bitlerinin beslenme oranının düşük olma ihtimali olduğunun, ancak SBY'de kısıtlı bir süre olmadığından yaprak bitlerinin inokulum kaynağı üzerinde mutlaka beslenmesinin sağlandığının,
- SBY'de inokulum kaynağı üzerinden yaprak bitlerinin sağlıklı bitkilere eşit miktarda geçiş ve taşıma olasılığının olmadığı, ancak KBY'de her sağlıklı bitki üzerine eşit miktarda yaprak biti aktarıldığından yaprak bitlerinin taşıma olasılıklarının eşit olduğunun,
- SBY'den biri olan doğrudan inokulum kaynağı bitkinin yaprağı kullanılarak kurulan denemelerin, diğer SBY olan indikatör bitkiyi doğrudan kullanarak kurulan denemelerden ve KBY'den daha pratik ve taşımada daha etkin olduğunun

Göz önünde bulundurulması gerekir.

PPV-T'nin bazı biyolojik özelliklerinin araştırılması kapsamında yapılan tüm çalışmalarla, PPV-T'nin *M. persicae* ile etkin olarak yayılabileceği, *A. gossypii* ile taşınabileceği ve *H. pruni* ile taşınma ihtimalinin zayıf olduğu belirlenmiştir. Bu bilgiler ışığında, PPV-T'nin kayısı yetiştiriciliğinin yoğun yapıldığı bölgelerde saptanması halinde, hangi yaprak bitlerine karşı önlem alınması gerektiğinin bilinmesi virüsün bölgede yayılımının engellenmesinde büyük katkılar sağlayacaktır. Ayrıca yaprak

bitlerinin polifag olması göz önüne alındığında, olası PPV enfeksiyonunu önlemek amacıyla da kayısı yetiştiriciliği yapılan alanlarda yabancı otlara karşı mücadele çalışmalarına dikkat edilmesi gerekmektedir. Tütün ve bezelye gibi tek yıllık bitki yetiştiriciliği yapılan alanlarda bahçe tesis ederken ayrıca dikkat edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

‘Melez kayısı bitkilerinde PPV’ye dayanıklılığın moleküler markörlerle araştırılması’ çalışmasında, Malatya İnönü Üniversitesi Kayısı Araştırma Merkezi’nde PPV’ye dayanıklılık kazandırılmak üzere açık arazide melezlenen SEO ve yerli çeşit (Hacıhaliloğlu, Çöloğlu, Adilcevaz5, Şekerpere, Çataloğlu) kayısılarından 134 adet melezin PPV dayanıklılık allellerini taşıyıp taşımadığı araştırılmıştır. Bu melezlerin, PGS1.21 ve PGS1.23 SSR primerleri ve FAM ile işaretlenmiş M13 primeri kullanılarak PCR analizleri yapılmıştır. Agaroz jel elektroforezi yapılan PCR ürünleri daha sonra kapillar elektroforez yöntemi ile ABI 3500xL Sequence Analyzer cihazında fragment analizi gerçekleştirilmiştir. Fragment analizi yapılan toplam 134 adet melezden, GeneMapper software 4.0 ile yorumlanması sonucunda 47 adet melezin PPV’ye dayanıklılık allelini taşıdığı tespit edilmiştir. Böylece, PPV’ye karşı dayanıklılık alleli taşıyan melez bitkileri belirlemede MAS yapılarak minimum 2 yıl sürecek olan fenotipleme periyodu için ön eleme gerçekleştirilebileceği kanıtlanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda dayanıklılık potansiyeli bulunmayan çeşit ve popülasyonlar arazi denemelerinden muaf tutularak zaman kazanılacaktır. Ayrıca bu çalışma ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda, arazi çalışması öncesinde Şarka’ya dayanıklı olarak belirlenen çeşitlerin arazide pomolojik yönden değerlendirilmesine öncelik verilebilecektir. Böylece hem dayanıklılık içerdiği bilinen hem de pomolojik açıdan iyi olduğu kanıtlanan çeşitler yetiştiricilere öncelikli olarak önerilebilecektir. İleride Malatya gibi kayısının altın değerinde olduğu bir ile en tehlikeli virüs hastalığı olan Şarka’nın girmesi halinde dayanıklı çeşit kullanan yetiştiricilerin bunun zararını en az ölçüde yaşayacakları düşünülmektedir.

Çizelge 5. 1. ‘PPV- T ırkının bazı biyolojik özelliklerinin belirlenmesi’ amacıyla yaprak bitleri ile yapılan deneysel taşıma denemelerinin içeriği ve sonuçları

Yaprak Bitleri	Deneme Şekli	İndikatör Bitki Adı	İnokulum Kaynağı Bitkiler	Toplam Bitki Sayısı	POZİTİF bitki sayısı/Toplam DAS- ELISA yapılan bitki sayısı	POZİTİF bitki sayısı/ Toplam Real time RT-PCR yapılan bitki sayısı	Real-time RT--PCR ile PPV Pozitif Bulunan Bitki Sayısı %	Deneme Detayları
M. persicae	Kontrollü beslenme yöntemi	Bezelye (P. sativum ‘Colmo’)	Myrobalan 29C (Ankara İzolatı)	60	0/ 60	13/ 60	21.60	23 ölü bitki
		Bezelye (P. sativum ‘Siena’)	Myrobalan 29C (Ankara İzolatı)	20	0/ 20	0/ 20	0	
	Kontrollü beslenme yöntemi	Tütün (N. benthamiana)	Kayısı (PPV- T doğal enfekteli)	60	0/37	2/ 37	5.40	
		Tütün (N. benthamiana)	Myrobalan 29C (Ankara İzolatı)	10	0/ 10	0/ 10	0	
		Tütün (N. benthamiana)	Tütün (Mekanik inok.)	10	2/ 10	2/ 10	20.00	
	Serbest beslenme yöntemi	Tütün (N. benthamiana)	Kayısı (PPV- T doğal enfekteli)	7	1/ 7	1/ 7	14.29	
		Tütün (N. benthamiana)	Tütün (Mekanik inok.)	8	1/ 8	1/ 8	12.50	
	A. gossypii	Kontrollü beslenme yöntemi	Bezelye (P.sativum ‘Colmo’)	Myrobalan 29C (Ankara İzolatı)	30	0/ 30	0/ 30	
Bezelye (P. sativum ‘Siena’)			Myrobalan 29C (Ankara İzolatı)	20	0/ 20	0/ 20	0	
Kontrollü beslenme yöntemi		Tütün (N. benthamiana)	Tütün (Mekanik inok.)	20	2/ 20	3/ 20	15.00	
Kontrollü beslenme yöntemi		Hıyar (C. sativus)	Tütün (Mekanik inok.)	20	0/ 12	0/ 12	0	
Serbest beslenme yöntemi		Tütün (N. benthamiana)	Tütün (Mekanik inok.)	10	0	0	0	
Kontrollü beslenme yöntemi		Myrobalan 29C	Myrobalan 29C (Ankara İzolatı)	6	0/ 5	0/ 5	0	1 ölü bitki

KAYNAKLAR

- Akbaş, B., Değirmenci, K., Çiftçi, O., Kaya, A., Yurtmen, M., Uzunoğulları, N., Çelik, N., Türkölmez, Ş., 2011. Update on *Plum pox virus* distribution in Turkey, **Phytopathol. Mediterr.**, 50: 75–83.
- Anonim, 2010. **Kayı- Badem Hastalık ve Zararlıları ile Mücadele**. TC. Tarım ve Köyşleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, 56 s, Ankara.
- Anonim, 2013a. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) taş çekirdekli meyveler 2013 yılı üretim verileri.
- Anonim, 2013b. **Kuru kayısı**, sektör raporları. Türkiye Cumhuriyeti Ekonomi Bakanlığı, İhracat Genel Müdürlüğü Tarım Ürünleri Daire Başkanlığı, 3 s, Ankara.
- Anonymous, 2012. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- Asma, B.M., 2000. **Kayı Yetiştiriciliği**. Evin Ofset, Malatya.
- Atanassoff, D., 1932. Plum pox a new virus disease. **Ann. Univ. Sofia Fac. Agric. Silvic.**, 11: 49- 69.
- Avinent, L., Hermoso de Mendoza, A. and Llacer, G., 1991. Comparison of traps for capture of alate aphids (Homoptera, *Aphidinea*) in apricot tree orchards. **Agronomie**, 11: 613- 618.
- Balazs, D., György, Z., Gutermuth, A., Pedryc, A., 2013. PPV resistant hybrids identification in splitting popuations with SSR markers. **2nd International Symposium on Plum pox virus**. Olomouc, Czech Republic, 52s.
- Büchen-Osmond, C. (Ed), 2006. **Index to ICTVdB virus descriptions**. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. ICTVdB Management, Mailman School of Public Health, Columbia University, New York, NY, USA.
- Cambra M., Capote N., Myrta A., Lla'cer G., 2006. *Plum pox virus* and the estimated costs associated with Sharka disease. **EPPO Bulletin**, 36, 202– 204.
- Candresse, T., Macquarie, G., Lanneau, M., Bousalem, M., Wetzel, T., Quiot-Douine, L., Quiot, J., Dunez, J., 1994. Detection of *Plum pox virus* and analysis of its molecular variability using immunocapture- PCR. **EPPO Bull.**, 24: 585–594.
- Candresse, T., Svanella-Dumas, L., Gentit, P., Caglayan, K. and Cevik, B., 2007. First report of the presence of *Plum pox virus* Rec strain in Turkey. **Plant Dis.**, 91: 331.
- Capote, N., Bertolini, E., Olmos, A., Vidal, E.,Martínez, M. C., Cambra, M., 2009. Direct sample preparation methods for the detection of *Plum pox virus* by real-time RT-PCR. **INTERNATIONAL MICROBIOLOGY**, 12: 1-6.

- Capote, N., Cambra, M., Botella, P., Gorris, M., Martinez, M., Lopez-Quilez, A. and Cambra, M., 2010. Detection, characterization, epidemiology and eradication of *Plum pox virus* Marcus type in Spain. **J. Plant Pathol.**, 92: 619–628.
- Cervera, M. T., Riechmann, J. L., Martin, M. T. and Garcia, J. A., 1993. Y-Terminal sequence of the *plum pox virus* PS and 66 isolates: evidence for RNA recombination within the potyvirus group. **Journal of General Virology**, 74: 329-334
- Ceylan, A., Gürcan, K., Ghaderi, M., Akbulut, M., Serçe, Ç. U., 2013. Transmission Route of New *Plum pox virus* introductions in Turkey. **2nd International Symposium on Plum pox virus**. Olomouc, Czech Republic, 19s.
- Clark, M.F., Adams, A.N., 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **J. Gen. Virol.**, 34: 474- 483.
- Comart, S., Gürcan, K., Say, A., Akbulut, M., Serçe, Ç. U., Kaymak, S., 2013. Detection and discrimination of *Plum pox virus* D, M and T strains with High-resolution melting analysis. **2nd International Symposium on Plum pox virus**. Olomouc, Czech Republic, 20.
- Crescenzi, A., d'Aquino, L., Comes, S., Nuzzaci, M., Piazzolla, P., Boscia, D. And Hadidi, A., 1997. Characterization of the sweet cherry isolate of *plum pox potyvirus*. **Plant Dis.**, 81, 711–714.
- Çağlayan, K., Serçe, C. U., Gazel, M., Kaya, K., Cengiz F. C., Vidal, E. and Cambra, M., 2013. Evaluation of the susceptibility of different prunus rootstocks to natural infection of *Plum pox virus*-T. **Journal of Plant Pathology**, 95 (3), 579- 586.
- Çağlayan, K., Serçe, Ç. U., Gazel, M., Polat, A., Voight, E., 2004. Reaction of Some Turkish Plum and Apricot Cultivars to *Plum pox virus*. **J. Turk.Phytopath.**, 3 (1-3): 19-24.
- Dallot, S., Gottwald, T., Labonne, G. and Quiot, J.B., 2003. Spatial pattern analysis of sharka disease (*Plum pox virus* strain M) in peach orchards of southern France. **Phytopathology**, 93: 1543–1552.
- Dallot, S., Glasa, M., Jevremovic, D., Kamenova, I., Paunovic, S. and Labonne, G., 2011. Mediterranean and central-eastern European countries host viruses of two different clades of *plum pox virus* strain M. **Arch. Virol.**, 156: 539–542.
- Damsteegt, V.D., Stone, A.L., Luster, D.G., Levy, L., Gildow, F.E. and Welliver, R., 2001. Preliminary characterization of a North American isolate of *Plum pox virus* from naturally infected peach and plum orchards in Pennsylvania, USA. **Acta Hortic.**, 550: 145–152.
- Damsteegt, V.D., Scorza, R.A., Stone, A.L., Schneider, W.L., Webb, K., Demuth, M., and Gildow, F.E., 2007. Prunus host range of *Plum pox virus* (PPV) in the United States by aphid and graft inoculation. **Plant Disease**, 91: 18- 23.

- Decroocq, V., Foulongne, M., Lambert, P., Le Gall, O., Mantin, C., Pascal, T., Schurdi-Levraud, V., Kervella, J., 2005. Analogues of virus resistance genes map to QTLs for resistance to sharka disease in *Prunus davidiana*. **Molecular Genetics and Genomics**, 272: 680– 689.
- Decroocq, V., Tricon, D., Decroocq, S., Mariette, S., Babayeva, S., Lambert, P., Roche, G., Audergon, J.M., Geuna, F., Bassi, D., Dondini, L., Tartarini, S., Salava, J., Zhebentyayeva, t., Abbott, A. G., 2013. Origin and diversity of sources of resistance to PPV in apricot: implications and use in marker-assisted resistance to sharka. **2nd International Symposium on Plum pox virus**. Olomouc, Czech Republic, 38s.
- Diaz-Vivancos, P., Clemente-Moreno, M. J., Rubio, M., Olmos, E., Garcia, J. A., Martinez-Gomez, P., Hernandez, J. A., 2008. Alteration in the chloroplastic metabolism leads to ROS accumulation in pea plants in response to plum pox virus. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 59, 8: 2147–2160.
- Dicenta, F., Martínez-Gómez, P., Burgos, L., Egea, J., 2000. Inheritance of resistance to *plum pox potyvirus* (PPV) in apricot (*Prunus armeniaca* L.). **Plant Breed.**, 119: 161–164.
- Dondini, L., Lain, O., Vendramin, V., Rizzo, M., Vivoli, D., Adami, M., Guidarelli, M., Gaiotti, F., Palmisano, F., Bazzoni, A., Boscia, D., Geuna, F., Tartarini, S., Negri, P., Castellano, M., Savino, V., Bassi, D., Testolin, R., 2010. Identification of QTL for resistance to *plum pox virus* strains M and D in Lito and Harcot apricot cultivars. **Mol Breeding**, 27: 289–299.
- Dosba, F., Orliac, S., Dutrannoy, F., Maison, P., Massonnie, G. and Audergon, J.M., 1992. Evaluation of resistance to *plum pox virus* in apticot trees. **Acta Hort.**, 309: 211- 220.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem Bull**, 19: 11– 15
- Elibüyük, İ.Ö., and G. Erdiller, 1991. Ankara ilinde kayısı, erik ve şeftali ağaçlarında görülen Sharka hastalığının yayılış alanlarının tesbiti ve tanısı üzerinde araştırmalar. **VI. Türkiye Fitopatoloji Derneği Yayınları**, 6: 414-415.
- Elibuyuk, I.O., Erdiller, G., 1995. The susceptibility of some apricot and plum varieties to Plum pox (Sharka) virus, **Acta Horticulturae**, 384: 549–552.
- Elibüyük, I. O., 2003. Natural spread of *Plum pox virus* in Ankara, Turkey. **J. Phytopathol.**, 151: 617- 619.
- Fanigliulo, A., Comes, S., Maiss, E., Piazzolla, P. and Crescenzi, A., 2003. The complete nucleotide sequence of *Plum pox virus* isolates from sweet (PPV-SwC) and sour (PPV-SoC) cherry and their taxonomic relationships within the species. **Arch. Virol.**, 148: 2137–2153.
- Gaborjanyi, R., and Basky, S., 1995. Correlation between migration of aphid vector and natural spread of plum pox virus. **Acta Hort.**, 386: 201- 206.
- Garcia J. A., Cambra M., 2007. *Plum pox virus* and sharka disease. **Plant Viruses** 1 (1): 69– 79.

- García, J. A., Glasa, M., Cambra, M. and Candresse, T., 2014. *Plum pox virus* and sharka: a model potyvirus and a major disease. **Mol Plant Pathol**, 15, 226–241.
- Gazel, M., Serce, C.U., Caglayan, K., 2010. New outbreaks of *Plum pox virus* in Turkey. **SharCo Research Workshop**, Sofia, Bulgaria: 27.
- Gildow, F. E., Damsteegt, V. D., Stone, A. L., Schneider, W. L., Luster, D. G., Levy, L., 2004. Transmission of three North American isolates of *Plum pox virus*: Identification of aphid vectors and species-specific transmission from infected stone fruits. **Acta Hort.**, 657: 207–211.
- Glasi, M., MarieJeanne, V., Labonne, G., Šubr, Z., Kudela, O. and Quiot, J.B., 2002. A natural population of recombinant *Plum pox virus* is viable and competitive under field conditions. **Eur. J. Plant Pathol.**, 108: 843–853.
- Glasi, M., Palkovics, L., Komínek, P., Labonne, G., Pittnerová, S., Kúdela, O., Candresse, T., Subr, Z., 2004. Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of *Plum pox virus* are genetically very similar and form a unique PPV subgroup. **Journal of General Virology**, 85: 2671–2681.
- Glasi M., Candresse T., 2005. Partial sequence analysis of an atypical Turkish isolate provides further information on the evolutionary history of *Plum pox virus* (PPV). **Virus Research**, 108: 199–206.
- Glasi, M., Malinowski, T., Predajna, L., Pupola, N., Dekena, D., Michalczyk, L. and Candresse, T., 2011. Sequence variability, recombination analysis, and specific detection of the W strain of *Plum pox virus*. **Phytopathology**, 101: 980–985.
- Glasi, M., Prihodko, Y., Predajna, L., Nagyová, A., Shneyder, Y., Zhivaeva, T., Šubr, Z., Cambra, M., and Candresse, T., 2013. Characterization of Sour Cherry Isolates of *Plum pox virus* from the Volga Basin in Russia Reveals a New Cherry Strain of the Virus. **Phytopathology**, 103 (9): 972–979.
- Guillet-Bellanger, I., Audergon, J.M., 2001. Inheritance of the Stark Early Orange apricot cultivar resistance to Plum pox virus. **Acta Horticulturae**, 550: 111–115.
- Gumus, M., Paylan, I.C., Matic, S., Myrta, A., Sipahioğlu, H.M., Erkan, S., 2007. Occurrence and distribution of stone fruit viruses and viroids in commercial plantings of *Prunus* species in western Anatolia, Turkey, **Journal of Plant Pathology**, 89: 265–268.
- Gürcan, K., Yılmaz, K.U., 2012. Şarka (*Plum Pox Virus*) hastalığı: kayısıda hastalığa dayanıklılığın genetiği ve moleküler çalışmalar. **Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, 28(5): 402–412.
- Gürcan, K., Ceylan, A., Akbulut, M., Değirmenci, K., 2013a. PPV-T common at home gardens of Central Anatolia. **2nd International Symposium on Plum pox virus**. Olomouc, Czech Republic, 21s.
- Gürcan, K., Ceylan, A., Akbulut, M., Comart, S., Akbaş, B., Ghaderi, M., 2013b. *Plum pox virus* D in Turkey. **2nd International Symposium on Plum pox virus**. Olomouc, Czech Republic, 22s.

- Isac, M., Preda, S. and Marcu, M., 1998. Aphid species- vectors of *plum pox virus*. **Acta Virol.**, 42: 233- 234.
- James D., Varga A., 2005. Nucleotide sequence analysis of *Plum pox virus* isolate W3174: evidence of a new strain. **Virus Research**, 110: 143- 150.
- Kajic, V., Černi, S. and Škoric, D., 2012. *Plum pox virus* on sour cherry in Croatia. In: **22nd International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops**, Rome, Book of Abstracts, 157.
- Kaya, K., Gazel, M., Serçe, Ç. U., Elçi, E., Cengiz, F. C., Cambra, M., Çağlayan, K., 2014. Potential vectors of *Plum pox virus* in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. **Entomologia Generalis**, Vol. 35, Issue 2: 137–150.
- Kegler, H. and Schade, C., 1971. *Plum pox virus*. **CMI/AAB Description of Plant Viruses**, No. 70.
- Kegler, H. and Sutic, D., 1991. *Plum pox potyvirus*. **Plant Virus Online**, Description and Lists from the VIDE Database.
- Kerlan, C. And Dunez, J., 1979. Differentiation biologique et serologique de souches de virus de la sharka. **Ann. Phytopath.**, 11: 241- 251.
- Koç, G. and Baloğlu, S., 2006. First report of Sharka in the Çukurova Region of Turkey. **Journal Of Plant Pathology**, 88: 65-67.
- Kurçman, S., 1973. Nachweis des scharka-virus an aprikosen und pflaumenbaumen in Ankara. **J. Turkish Phytopathol.**, 2: 124- 129.
- Labonne, G., Lauriaut, F., Yvon, M., and Quiot, J. B., 1994. Aphid transmission of *Plum pox potyvirus*: Analysis of potential vectors in an apricot orchard. **Bull. OEPP**, 24, 681- 690.
- Labonne, G., Yvon, M., Quiot, J. B., Avinent, L., and Llacer, G., 1995. Aphids as potential vectors of *plum pox virus*: comparison of methods of testing and epidemiological consequences. **Acta Hortic.**, 386: 207- 218.
- Labonne, G. and Dallot, S., 2006. Epidemiology of sharka disease in France. **EPPO Bull.**, 36, 268– 270.
- Lalli, D. A., Abbott, A. G., Zhebentyayeva, T. N., Badenes, M. L., Damsteegt, V., Polak, J., Krs'ka, B., Salava, J., 2008. A genetic linkage map for an apricot (*Prunus armeniaca* L.) BC1 population mapping plum pox virus resistance. **Tree Genet Genomes**, 4: 481– 493.
- Lambert, P., Dicenta, F., Rubio, M., Audergon, J. M., 2007. QTL analysis of resistance to sharka disease in the apricot (*Prunus armeniaca* L.) 'Polonais' 9 'Stark Early Orange' F1 progeny. **Tree Genet Genomes**, 3: 299– 309.
- Latham D. R. and Mills, N. J., 2011. Effects of temperature on the life history parameters and population growth rates of *Hyalopterus pruni* (Hemiptera: Aphididae). **Journal of Economic Entomology** (Impact Factor: 1.6), 104(6): 1864- 1869.

- Levy, L., Hadidi, A., 1994. A simple and rapid method for processing PPV-infected tissue for use with PPV-specific 3' non-coding region RT-PCR assays. **EPPO Bull.**, 24: 595–604.
- Levy, L., Damsteegt, V., and Welliver, R., 2000. First report of *Plum pox virus* (sharka disease) in *Prunus persica* in the United States. **Plant Dis.**, 84:202.
- Llacer, G., and Cambra M., 1998. Thirteen years of sharka disease in Valencia, Spain. **Acta Hort.**, 472: 379- 384.
- Lopez-Moya, J. J., Fernandez-Fernandez, M. R., Cambra, M., Garcia J. A., 2000. Biotechnological aspects of *Plum pox virus*. **Journal of Biotechnology**, 76, 121– 136.
- Lupoli, R., Labonne, G. and Yvon, M., 1992. Variability in the transmission efficiency of potyviruses by different clones of *Aphis gossypii*. **Entomol. Exp. Appl.**, 65: 291- 300.
- Maejima, K., Hoshi, H., Hashimoto, M., Himeno, M., Kawanishi, T., Komatsu, K., Yamaji, Y., Hamamoto, H., Namba, S., 2010. First report of *plum pox virus* infecting Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) in Japan. **J. Gen. Plant. Pathol.**, 76: 229– 231.
- Malinowski, T., Sowik, I., Salavei, A.V. and Kukharchyk, N.V., 2012. Partial characterisation of biological properties of PPV-C isolates found in Belarus and establishment of in vitro cultures of infected L2 and OWP-6 rootstocks. **22nd International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, Rome**, Book of Abstracts, 152.
- Manachini, B., Casati, P., Cinanni L., and Bianco, P., 2007. Role of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) and Its Secondary Hosts in *Plum Pox Virus* Propagation. **J. Econ. Entomol.**, 100(4): 1047- 1052.
- Marandel, G., Salava, J., Abbott, A., Candresse, T., Decroocq, V., 2009a. Quantitative trait loci meta-analysis of *Plum pox virus* resistance in apricot (*Prunus armeniaca* L.): new insights on the organization and the identification of genomic resistance factors. **Mol Plant Pathol**, 10: 347– 360.
- Marandel, G., Pascal, T., Candresse, T., Decroocq, V., 2009b. Quantitative resistance to *Plum pox virus* in *Prunus davidiana* P1908 is linked to components of the eukaryotic translation initiation complex. **Plant Pathology**, 58: 425– 435.
- Margaritopoulos, J.T., Tzortzi1, M., Zarpas, K.D., Tsitsipis, J.A. and Blackman, R.L., 2006. Morphological discrimination of *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) populations feeding on Compositae. **Bulletin of Entomological Research**, 96: 153– 165.
- Martínez-Gómez, P., Dicenta, F. and Audergon, J. M., 2000. Behaviour of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars in the presence of sharka (*Plum pox potyvirus*): a review. **Agronomie**, 20: 407– 422.
- Matic, S., Al-Rwahnih, M. and Myrta, A., 2006. Diversity of *Plum pox virus* isolates in Bosnia and Herzegovina. **Plant Pathol.**, 55: 11–17.

- Matic, S., Elmaghraby, I., Law, V., Varga, A., Reed, C., Myrta, A. and James, D., 2011. Serological and molecular characterization of isolates of *Plum pox virus* strain El Amar to better understand its diversity, evolution, and unique geographical distribution. **J. Plant Pathol.**, 93: 303–310.
- Mavrodieva, V., James, D., Williams, K., Negi, S., Varga, A., Mock, R. and Levy, L., 2013. Molecular analysis of a *Plum pox virus* W isolate in plum germplasm hand carried into the USA from the Ukraine shows a close relationship to a Latvian isolate. **Plant Dis.**, 97: 44–52.
- Milusheva, S., Bozhkova, V., 2013. Reaction of six *Prunus* rootstocks to *Plum pox virus* in conditions of Plovdiv Region of Bulgaria. **2nd International Symposium on Plum pox virus**. Olomouc, Czech Republic, 59.
- Moustafa, T.A., Badenes, M.L., Martinez-Calvo, J., Llacer, G., 2001. Determination of resistance to sharka (plum pox) virus in apricot. **Sci. Hort.**, 91: 57–70.
- Myrta, A., Boscia, D., Potere, O., Kolber, M., Nemeth, M., DiTerlizzi, B., Cambra, M. and Savino, V., 2001. Existence of two serological subclusters of *Plum pox virus*, strain M. Eur. **J. Plant Pathol.**, 107: 845–848.
- Nemchinov, L., Hadidi, A., Maiss, E., Cambra, M., Candresse, T. and Damsteegt, V., 1996. Sour cherry strain of *Plum pox potyvirus* (PPV): Molecular and serological evidence for a new subgroup of PPV strains. **Phytopathol**, 86: 1215–1221.
- Nemchinov, L., Hadidi, A., Kölber, M. and Németh, M., 1998. Molecular evidence for the occurrence of plum pox virus—cherry subgroup in Hungary. **Acta Hort.**, 472: 503–510.
- Németh, M (1986). Virus, Mycoplasma and Rickettsia Disease of Fruit Trees. **Akadémia Kiadó**, Budapest, 840.
- Ng, J.C. and Falk, B.W. (2006). Virus–vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. **Annu. Rev. Phytopathol**, 44: 183–212.
- Olmos A., Bertolini E., Gil M., Cambra M., 2005. Real-time assay for quantitative detection of non persistently transmitted *Plum pox virus* RNA targets in a single aphids. **J Virol Methods**, 128: 151–155.
- Pilarova, P., Marandel, G., Decroocq, V., Salava, J., Krka, B., Abbott, A. G., 2010. Quantitative trait analysis of resistance to *plum pox virus* in the apricot F1 progeny “Harlayne” 9 “Vestar”. **Tree Genet Genomes**, 6: 467–475.
- Prihodko, Y., Mazurin, E., Zhivaeva, T., Shneyder, Y., and Sokolova, E., 2011. Study of the PPV strains. **Zashch. Karantin Rast.** (Plant Prot. Quarantine) 11: 29–32 (in Russian).
- Reyes, F., Fiore, N., Reyes, M.A., Sepúlveda, P., Paredes, V. and Prieto, H., 2003. Biological behavior and partial molecular characterization of six Chilean isolates of *Plum pox virus*. **Plant Dis.**, 87: 15–20.

- Roy, A. S., and Smith, I. M., 1994. Plum pox situation in Europe. **EPPO Bull.** 24: 515-523.
- Sahtiyancı, S., 1969. Virus de la sharka chez le prunier. **Bulletin Phytosanitaire FAO**, 17: 69.
- Schneider, L. W., Sherman, D. J., Stone, A. L., Damsteegt, V. D., Frederick, R. D., 2004. Specific detection and quantification of Plum pox virus by real-time fluorescent reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods* 120: 97–105. Schneider L.W., Damsteegt, V., Gildow F., Stone, A., Sherman, D., Levy, L., Mavrodieva, V., Richwine, N., Welliver, R., and Luster, D., 2011. **Molecular, Ultrastructural, and Biological Characterization of Pennsylvania Isolates of Plum pox virus.**, 101 (5): 627- 636.
- Schuelke, M., 2000. An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. **Nat Biotechnol**, 18: 233– 234.
- Sertkaya, G., Ulubaş, Ç., Çağlayan, K., 2003. Detection and characterization of *Plum pox potyvirus* (PPV) by DAS-ELISA and RT-PCR / RFLP Analysis in Turkey. **Turk J Agric For**, 27: 213- 220.
- Sheveleva, A., Ivanov, P., Prihodko, Y., James, D. and Chirkov, S., 2012. Occurrence and genetic diversity of Winona-like *Plum pox virus* isolates in Russia. **Plant Dis.**, 96: 1135–1142.
- Shukla, D. D., Ward, C. W., Brunt, A. A., 1994. *Plum pox virus*. In *The Potyviridae*. CABInternational, Wallingford, Oxon, United Kingdom, 382- 385.
- Singh, M. N., Khurana, S.M.P. and Nagaich, B. B., 1983. Evidence on heredity variations in the virus transmission efficiency of aphid clones. **Z. Pflanz**, 90: 345- 351.
- Sohi, S. S. and Swenson, K. G., 1964. Pea aphid biotypes differing in bean yellow mosaic virus transmission efficiency of aphid clones. **Entomol. Exp. Appl.**, 7: 9- 14.
- Soriano, J. M., Domingo, M. L., Zuriaga, E., Romero, C., Zhebentyayeva, T., Abbott, A. G., Badenes, M. L., 2012. Identification of simple sequence repeat markers tightly linked to *Plum pox virus* resistance in apricot. **Mol Breeding**, 30: 1017-1026.
- Soriano, J. M., Vera-Ruiz, E. M., Vilanova, S., Martinez-Calvo, J., Llacer, G., Badenes, M.L., Romero, C., 2008. Identification and mapping of a locus conferring *Plum pox virus* resistance in two apricot improved linkage maps. **Tree Genet Genomes**, 4: 391– 402.
- Sutic, D. D., Ford, R. E., and Tomic, M. T., 1999. Sutic, D.D., Ford, R.E., and Tomic, M.T., 1999. **Handbook of plant virus diseases**. CRC Press. London, NewYork, Washington.
- Thakur, P. O., Bharaway, S.W., Garg, I. D., Khosla, K., Sharma, D. R., 1994. *Plum pox virus* on stone fruits from India. A new record. **Plant Disease**, 9: 100- 102.

- Thompson, D., McCann, M., MacLeod, M., Lye, D., Green, M., James, D., 2001. First report of *Plum pox potyvirus* in Canada. **Plant Dis.**, 85(1): 97.
- Thompson, D., Varga, A., De Costa, H., Birch, C., Glasa, M. and James, D., 2009. First report of Plum pox virus recombinant strain on *Prunus* spp. in Canada. **Plant Dis.**, 93: 674.
- Ulubaş Serçe, C., Candresse, T., Svanella- Dumas, L., Krizbai, L., Gazel, M., and Çağlayan, K. 2009. Further characterization of a new recombinant group of *Plum pox potyvirus* isolates, PPV-T, found in orchards in the Ankara province of Turkey. **Virus Res.**, 142: 121- 126.
- Ulubaş Serçe, Ç., Gazel, M., Çağlayan, K., 2013a. Diversity of *Plum pox virus* isolates in Turkey. **2nd International Symposium on Plum pox virus**. Olomouc, Czech Republic, 27s.
- Ulubaş Serçe, Ç., Gazel, M., Çağlayan, K., Asma, B. M., Badenes, M. L., 2013b. Screening for resistance to *Plum pox virus* in some local Turkish apricot cultivars and their crosses by molecular markers. **2nd International Symposium on Plum pox virus**. Olomouc, Czech Republic, 55s.
- Varveri, C., 2006. Epidemiology of *Plum pox virus* strain M in Greece. **OEPP/EPPO Bulletin**, 36: 276-278.
- Vera- Ruiz, E.M., Soriano, J.M., Romero, C., Zhebentyayeva, T., Terol, J., Zuriaga, E., Llacer, G., Abbott, A.G., Badenes, M.L., 2011. Narrowing down the apricot *Plum pox virus* resistance locus and comparative analysis with the peach genome syntenic region. **Mol Plant Pathol**, 12: 535– 547
- Wallis, C. M., Fleischer, S. J., Luster, D. and Gildow, F. E., 2005. Aphid (Hemiptera: Aphididae) Species Composition and Potential Aphid Vectors of *Plum Pox Virus* in Pennsylvania Peach Orchards. **Journal of Economic Entomology**, 98(5): 1441- 1450.
- Wallis, C. M., Stone, A. L., Sherman, D. J., Damsteegt, V. D., Gildow, F. E., and Schneider W. L., 2007. Adaptation of *plum pox virus* to a herbaceous host (*Pisum sativum*) following serial passages. **Journal of General Virology**, 88: 2839–2845.
- Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro, M., Dunez, J., 1992. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for *Plum pox virus* detection. **Journal of Virological Methods**, 39, 27– 37.
- Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M., Delbos, R.P., Mazyad, H., Aboul-Ata, A. E. and Dunez, J., 1991. Nucleotide sequence of the T-terminal region of the RNA of the El Amar strain of *Plum pox potyvirus*. **Journal of General Virology**, 72: 1741-1746.
- Yürektürk, M., 1984. Marmara bölgesinde sert çekirdekli meyvelerde görülen sharka hastalığı üzerinde araştırmalar. **Atatürk Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü**, 37s.
- Zeyen, R. L., and Berger, P. H., 1990. Is the concept of short retention time for aphid-borne nonpersistent plant viruses sound. **Phytopathology**, 80: 769- 771

ÖZGEÇMİŞ

Yazar, 1983 yılında Tarsus’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini burada tamamladı. 2001 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi’ni kazandı ve 2005 yılında mezun oldu. Aynı yıl M.K.Ü’nin açmış olduğu Yüksek Lisans sınavını kazandı. Yüksek Lisans eğitimini bir yıl süreyle dondurarak CIHEAM (International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies) kurumunun sağladığı bursla İtalya’nın Bari şehrinde (IAMB) 8 ay süreyle genel Bitki Koruma eğitimi aldı. 2006-2007 yıllarında M.K.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda “Doğu Akdeniz Bölgesi Zeytin Bahçelerindeki Virüslerin Yaygınlığının RT-PCR ile Belirlenmesi ve Karakterizasyonu” konulu Yüksek Lisans tez çalışmasını başarıyla yürüttü ve 2008 yılında Ziraat Yüksek Mühendisi olarak mezun oldu. 2011 yılında, T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı İzmir Zirai Karantina Müdürlüğü’ne Viroloji Uzmanı olarak atandı ve halen burada çalışmaktadır.

EKLER

Ek 1. DAS- ELISA Analizinde Kullanılan Tampon Çözeltilerin İçerikleri

1. PBS 1X

1000 ml suda çözündürülmek üzere:

NaCl	8 g
Na ₂ HPO ₄ - 12H ₂ O	2.9 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
KCl	0.2 g
NaN ₃	0.2 g
pH 7.4 olarak ayarlanır.	

2. PBST 1X = Washing Buffer (Yıkama tampon çözeltisi)

1000 ml PBS buffer'a eklenmek üzere:

Tween20	0.5 ml
pH 7.4 olarak ayarlanır.	

3. Genel Örnek Ezme Tampon Çözeltisi

1000 ml PBS 1X'e eklenmek üzere:

PVP (M _w 10,000- 40,000)	10 g
Tween20	0.5 ml
pH 7.3 olarak ayarlanır.	

4. Coating Buffer (Kaplama tampon çözeltisi) 1X

1000 ml suda çözündürülmek üzere:

Na ₂ CO ₃	1.59 g
NaHCO ₃	2.93 g
NaN ₃	0.2 g
Bromocresol purple	5 mg
pH 9.6 olarak ayarlanır.	

5. Conjugate Buffer (Enzimle işaretleme tampon çözeltisi) 1X

1000 ml PBST 1X'eklenmek üzere:

BSA	2 g
-----	-----

Congo Red 40mg
pH 7.4 olarak ayarlanır.

6. Substrate Tampon Çözeltisi

1000 ml suda çözündürülmek üzere:
Diethanolamine 97 ml
NaN₃ 0.2 g
pH HCl ile 9.8 olarak ayarlanır.

Ek 2. High Pure Viral Nucleic Acid Kit Kimyasallarının Analize Hazırlanması

1. Proteinaz K

Liyofilize toz halde bulunan Proteinaz K üzerine 5 ml Elution buffer eklenir ve karıştırılır. – 15 °C veya - 25 °C’de muhafaza edilir.

2. Poly (A)

Liyofilize toz halde bulunan Poly (A) üzerine 0,5 ml Elution buffer eklenir ve karıştırılır. – 15 °C veya - 25 °C’de muhafaza edilir.

50 µl Poly (A), 2,5 ml Binding buffer içerisine eklenerek kullanılır. Bu karışım kullanımdan hemen önce örnek sayısına göre hazırlanır.

3. Inhibitor Removal Buffer

Inhibitor Removal buffer üzerine 20 ml saf ethanol eklenir ve kullanıma hazır hale getirilir. + 15 °C veya + 25 °C’de muhafaza edilir.

4. Wash Buffer

Wash buffer üzerine 40 ml saf ethanol eklenir ve kullanıma hazır hale getirilir. +15 °C veya +25 °C’de muhafaza edilir.