



T.C.

HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Plum pox virus (PPV) İLE İNOKULE EDİLEN TEST BİTKİLERİNDE  
VİRÜS HAREKETİNİN KANTİTATİF OLARAK BELİRLENMESİ VE  
KAYSERİ İLİNDE PPV-T İRKİNİN EPİDEMİYOLOJİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI***

Cemile TEMUR ÇINAR

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DOKTORA

HATAY

ARALIK-2019



T.C.  
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Plum pox virus (PPV) İLE İNOKULE EDİLEN TEST BİTKİLERİNDE  
VİRÜS HAREKETİNİN KANTİTATİF OLARAK BELİRLENMESİ VE  
KAYSERİ İLİNDE PPV-T İRKİNİN EPİDEMİYOLOJİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI***

**Cemile TEMUR ÇINAR**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI  
DOKTORA**

**HATAY  
ARALIK-2019**

**T.C.**  
**HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Plum pox virus (PPV) İLE İNOKULE EDİLEN TEST BİTKİLERİNDE***  
**VİRÜS HAREKETİNİN KANTİTATİF OLARAK BELİRLENMESİ VE**  
**KAYSERİ İLİNDE PPV-T İRKİNİN EPİDEMİYOLOJİSİNİN**  
**ARAŞTIRILMASI**

**Cemile TEMUR ÇINAR**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN** danışmanlığında hazırlanan bu tez .../.../2019 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **OYBİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

.....  
Başkan

.....  
Üye

.....  
Üye

.....  
Üye

.....  
Üye

**Kod No:**

**Prof. Dr. ....**  
**Enstitü Müdürü**

Bu çalışma HMKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

Proje No:

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.

05.12.2019

## 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.

İmza

**Cemile TEMUR ÇINAR**

## ÖZET

### ***Plum pox virus* (PPV) İLE İNOKULE EDİLEN TEST BİTKİLERİNDE VİRÜS HAREKETİNİN KANTİTATİF OLARAK BELİRLENMESİ VE KAYSERİ İLİNDE PPV-T İRKİNİN EPİDEMİYOLOJİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Şarka hastalığına neden olan *Plum pox virus* (PPV) *Potyviriidae* familyasına bağlı *Potyvirus* cinsinin bir üyesidir. Dünya çapında yaygın olan Şarka hastalığı ülkemizde de son yıllarda yaygınlaşmaya başlamıştır. Bu virüsün bugüne değin saptanmış olan 9 ırkı arasında yer alan PPV-Turkey (PPV-T) sadece ülkemize özgü bir ırk olup son yıllarda karakterizasyonu yapılmıştır. Bu çalışma ile Kayseri ilinde doğal enfeksiyon koşullarında PPV-T'nin farklı *Prunus* anaçlarına karşı reaksiyonları ve PPV-T ile yapay olarak inokule edilen test bitkilerinde virüs hareketinin kantitatif olarak belirlenmesi araştırılmıştır.

Bu çalışmanın iki temel amacı bulunmakta olup birinci çalışma paketinde PPV-T ırkının bitki içerisinde yayılma hızı araştırılmıştır. PPV'nin deneysel konukçusu olan *Nicotiana benthamiana* bitkisinde mekanik inokulasyon sonrası yapılan Real Time qPCR analizleri sonucunda virüsün iki ile dört gün içerisinde alttan 3-5. yaprağa ulaştığı tespit edilmiştir.

İkinci çalışma paketinde PPV-T'nin doğal yayılma potansiyelinin belirlenmesi amaçlanmıştır. PPV-T ile enfekteli olduğu belirlenmiş olan kayısı, erik ve şeftali ağaçları bulunan bir üretici bahçesine *Prunus* spp. için anaç olarak kullanılabilen, PPV'den ari olarak *in vitro* koşullarda üretilmiş olan Nemaguard (*Prunus persicae* × *P. davidiana*), Myrobolan 29 B ve C (*P. cerasifera*), Garnem (*P. dulcis* × [(*P. persica* × *P. davidiana*) × *P. persica*]) ve GF677 (*P. amygdalus* × *P. persica*) dikilmiştir. Her bir anaçtan 200 adet olmak üzere deneme 10 tekerrürlü olarak tesadüfi deneme bloklarına göre planlanmıştır. Deneme parselinde kullanılan anaçlar 2015, 2016 ve 2017 yıllarında ve yılda iki kez (ilkbahar ve sonbahar) olmak üzere 5B-IVIA monoklonal antikorları kullanılarak DAS-ELISA analizleri yanında RT-PCR ile de testlenmiştir. Çalışmanın sonucuna göre PPV-T enfeksiyonuna en hasas anaç %3,61 enfeksiyon oranı ile Nemaguard olmuş, bunu %2,74 ile Myrobolan 29C ve %1,04 ile Myrobolan 29B takip etmiştir. Diğer anaçlar üç yıl boyunca yapılan testlemelerde gerek DAS-ELISA gerekse RT-PCR analizleri sonucunda PPV ile enfekteli bulunmamıştır.

Deneme parselinde en yaygın afit türleri olarak *Aphis gossypii*, *A. craccivora*, *A. spiraecola*, *Brachycaudus helichrysi*, *Hyalopterus pruni*, *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae* ile teşhisi yapılamayan diğer bazı afit türleri saptanmıştır. Real Time RT-PCR analizlerine göre; 2015 yılında testlenen afitlerde PPV bulunma oranı en yüksek *A. gossypii*'de (%100) saptanmış olup bunu sırasıyla *B. helichrysi* (%77,77), *A. spiraecola* (%55,72), *M. persicae* (%46,05), *H. pruni* (%30,76) ve diğer afit türleri (%30,76) izlemiştir. 2016 yılında ise en yüksek PPV ile enfeksiyon oranı %100 ile *A. gossypii* ve *M. euphorbiae*'da saptanmış olup bunu sırasıyla *A. spiraecola* (%76,32), *M. persicae* (%73,1), *B. helichrysi* (%61,53), teşhisi yapılamayan diğer türler (%50) ve *H. pruni* (%62,06) izlemiştir.

Bu çalışma sonucunda PPV-T'nin Kayseri ilinde doğal koşullarda afitlerle etkin bir şekilde taşındığı ve *Prunus* türleri için anaç olarak PPV'ye duyarlı olduğu tespit edilen Nemaguard ve Myrobolan gibi anaçların tercih edilmemesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

2019, 82 Sayfa

**Anahtar kelimeler:** Şarka hastalığı, PPV-Türkiye, anaç reaksiyonları, DAS-ELISA, afit, Real-Time qPCR.



## ABSTRACT

### DETERMINATION OF *Plum pox virus* (PPV) MOVEMENT THROUGH INOCULATED TEST PLANTS BY QUANTITATIVE METHODS AND EPIDEMIOLOGICAL ASPECT OF PPV-T IN KAYSERI PROVINCE

*Plum pox virus* (PPV), which causes Sharka disease, is a member of the *Potyvirus* genus of the *Potyviridae* family. The disease could be detected all over the world as well as recently widespread in Turkey. Currently, nine PPV strains had been identified and among them, PPV-Turkey (PPV-T) is a unique strain found only in Turkey and it has recently been characterized. The aims of the present study were to identify the susceptibility of six different *Prunus* rootstocks to PPV-T under natural inoculum conditions in Kayseri province, located in Central Anatolia region of Turkey and to identify PPV-T movement in inoculated test plants by using Real-Time quantitative PCR.

There are two main aims in this study. In the first working package, the movement and concentration of PPV-T in inoculated *Nicotiana benthamiana* was studied by using Real Time qPCR method. The experiment was designed as 10 replications and 7-8 mm diameters leaf discs were collected from the inoculated tobacco plants every day starting from the first inoculation day. According to Real Time qPCR results, PPV reached 3<sup>rd</sup> to 5<sup>th</sup> leaves from the bottom in 2-4 days after the inoculation.

In the second working package, determination of natural spreading potential of PPV-T was studied. The experimental plot was established near a naturally PPV-T infected orchard which was mixed plantation with apricot, plum and peach. Five different rootstocks which was produced in vitro condition as PPV-free such as Nemaguard (*P. persicae* × *P. davidiana*), Myrobalan 29 B and C (*P. cerasifera*), Garnem (*P. dulcis* × [(*P. persica* × *P. davidiana*) × *P. persica*]) and GF677 (*P. amygdalus* × *P. persica*) were planted in this plot. From each rootstock, 200 plants were planted and experiment was designed in a randomized complete block design with 10 replications per block. All rootstocks were regularly tested with 5B-IVIA monoclonal antibody in DAS-ELISA and RT-PCR both spring and autumn during 2015-2017. The most susceptible rootstocks in terms of PPV-T infection rate was detected as Nemaguard, Myrobalan 29B and Myrobalan 29 C with the infection rate of 3.61%, 2.74% and 1.04% by DAS-ELISA, respectively. On the other hand, GF677 and Garnem were never found infected with PPV-T.

*Aphis gossypii*, *A. craccivora*, *A. spiraecola*, *Brachycaudus helichrysi*, *Hyalopterus pruni*, *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae* and some unidentified aphid species were detected as most abundant species in experimental plot. In 2015, the highest percentage of viruliferous aphids was found in *A. gossypii* (100%), followed by *B. heliochrysi* (77.77%), *A. spiraecola* (55.72%), *M. persicae* (46.05%), *H. pruni* (30.76%) and unidentified aphid species (30.76%) whereas it was 100% for *A. gossypii* and *M. euphorbiae* followed by *A. spiraecola* (76.32%), *M. persicae* (73.1%), *B. heliochrysi* (61.53%), unidentified aphid species (50%), and *H. pruni* (62.06%) in 2016.

As a result of this study, it was concluded that PPV-T was effectively transmitted by different aphid species in natural conditions in Kayseri province of Turkey. Nemaguard and Myrobalan which were found to be the most sensitive rootstocks to PPV-T should not be preferred to use by farmers as *Prunus* rootstock.

2019, 82 pages

**Keywords:** Sharka disease, PPV-Turkey, rootstock reactions, DAS-ELISA, aphid, Real-Time qPCR.





## TEŞEKKÜR

Bu tez çalıőmasının her aőamasında değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaőarak çalışmanın tamamlanmasında büyük emeği geçen, akademik ve mesleki alanda geliőme kaydetmemde çok büyük katkıları olan tez danıőman hocalarım Prof. Dr. Kadriye AğLAYAN ve Doç. Dr. Kahraman GÜR CAN'a, sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Bilgi, tecrübesi ve samimiyetiyle yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, yapıcı ve yönlendirici tavsiyelerde bulunan değerli hocalarım, Prof. Dr. Çiğdem ULUBAŞ SERÇE'ye, Prof. Dr. Gülşen SERTKAYA'ya ve Dr. Öğr. Üyesi Eminur ELÇİ'ye

Çalıőmam süresince manevi desteklerini tezimin her aőamasında hissettiren, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli arkadaşım Dr. Maryam Ghaderi SOHİ'ye ve meslektaşlarım, Yük. Zir. Müh. Yunus Emre TAŞKESEN, Yük. Zir. Müh. Hanife BULUT, Yük. Zir. Müh. Furkan KANARYA ve Yük. Zir. Müh. Duygu ERASLAN'a,

Erciyes Üniversitesinde (ERÜ) yaptığım çalışmalarda laboratuvar imkanı sağlayan ERÜ Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK) yöneticilerine ve Bitki Biyoteknolojisi Birimi alıőanlarına,

Tez çalıőmasında önemli bir aőama olan anaçların dikilmesi için belirlediğimiz bölgede bahçelerini kullanmamıza izin veren Arif KARADELİ ve Burhanettin KARADELİ'ye

Tezimin her aőamasında ve hayatımın her alanında bana büyük bir özveri ve sabırla destek olan, varlıklarıyla hayatımı anlamlandıran aileme, eőime ve oğluma sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	X
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
2.1. Türkiye’de PPV Irk Dağılımı ile İlgili Yapılmış Çalışmalar.....	5
2.2. Plum pox virüs Irklarının Konukçu Bitki İçerisinde Hareketi ile İlgili Yapılmış Çalışmalar.....	7
2.3. Plum pox virus’un Vektör Afet Türleri ile Taşınması ve Vektör Bünyesinde Virüsün Varlığının Belirlenmesi ile İlgili Çalışmalar.....	9
2.4. Plum pox virüs’üne Karşı Anaç Duyarlılığının Belirlenmesi ile İlgili Çalışmalar.....	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
3.1. MATERYAL.....	17
3.1.1. Biyolojik İndeksleme.....	17
3.1.2. Epidemiyolojik Çalışmalar.....	17
3.1.3. Serolojik ve Moleküler Çalışmalar.....	17
3.2. YÖNTEM.....	18
3.2.1. Real-Time PCR Optimizasyonu ve <i>Nicotiana benthamiana</i> ile GF305 Bitkilerinde PPV’nin Hareketinin İncelenmesi.....	18
3.2.1.1. <i>Nicotiana benthamiana</i> ve GF 305 Bitkilerinin Yetiştirilmesi.....	18
3.2.1.2. PPV-T’nin <i>Nicotiana benthamiana</i> ’ya İnokulasyonu ve Virüs Yayılmasının İzlenmesi.....	19
3.2.1.3. Real Time qPCR Reaksiyonu için Standart Hazırlanması.....	22
3.2.1.3.1. TOPO® XL PCR Cloning Kit ile Klonlama Aşamaları.....	22
3.2.1.3.2. TOPO® XL Vektöre Gen Aktarılması.....	23
3.2.1.3.3. JM 109 <i>E. coli</i> Hücrelerine Rekombinant Plazmitlerin Transformasyonu.....	23
3.2.1.3.4. Plasmid izolasyonu ve Klonların Analizi.....	24
3.2.1.4. Real Time qPCR Analizleri.....	25
3.2.2. Kayseri İlinde PPV-T’nin Doğal Koşullarda Taşınması, Olası Vektörlerin Belirlenmesi ve Anaç Duyarlılık Çalışmaları.....	26
3.2.2.1. PPV-T ile Enfekteli Bahçe Seçimi ve Anaç Parseli Tesisi.....	26
3.2.2.2. DAS- ELISA Analizleri.....	28
3.2.2.3. Bitkisel Materyalden Total RNA İzolasyonu.....	29
3.2.2.4. cDNA Sentezi ve RT-PCR (Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Analizleri.....	30
3.2.2.5. Afet Türlerinin Belirlenmesi.....	30
3.2.2.6. Afet Bünyesinde PPV’ün Bulunma Durumunun Real Time Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi ile Saptanması.....	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	33

4.1. Real-Time qPCR Optimizasyonu ve <i>Nicotiana benthamiana</i> Bitkisinde Plum pox virus (PPV)'ün Hareketinin İncelenmesi.....	33
4.2. Topo XL Klonlama Vektöründe Tüm Genomun Varlığının PCR Analizleri İle Doğrulanması.....	38
4.3. Kayseri ili Koşullarında Bazı <i>Prunus</i> Anaçlarının Plum pox virus'üne (PP-V) Duyarlılığının Belirlenmesi .....	39
4.3.1. Simptomolojik Gözlemler.....	39
4.3.1.1. Deneme Parselinde Plum pox virus Simptomu Gösteren Anaçlar ....	39
4.3.1.2. Plum pox virus-Turkey (PPV-T) ile Enfekteli Olan Deneme Parselinin Çevresinde Bulunan <i>Prunus spp.</i> Bahçesinde Simptomolojik Gözlemler .....	41
4.3.2. Deneysel Anaç Parselinde Bulunan Anaçların ve Etrafındaki Prunusların DAS ELISA ve RT-PCR Analiz Sonuçları .....	43
4.3.3. Afit Türlerinin Teşhisi .....	61
4.3.3.1. Afit Bünyesinde PPV'ün Bulunma Durumunun Real Time Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi ile Saptanması.....	64
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	70
KAYNAKLAR .....	73
ÖZGEÇMİŞ .....	79

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Plum pox virus ırklarının Dünya'daki dağılımı (EPPO, 2019) .....	5
Şekil 2.2. Plum pox virüs ırklarının Türkiye'deki dağılımı (Gürcan ve Ceylan, 2016) ...	7
Şekil 3.1. Biyolojik indeksleme amacıyla odunsu indikatör bitkisi olarak kullanılacak GF 305 anacı yetiştirme çalışmaları .....	19
Şekil 3.2. <i>Nicotiana benthamiana</i> bitkilerine PPV-T ırkının mekanik inokulasyonu ....	20
Şekil 3.3. <i>Nicotiana benthamiana</i> bitkilerinden disk şeklinde örnek alma işlemi.....	21
Şekil 3.4. <i>Nicotiana benthamiana</i> bitkilerinden örnek alma işleminin şematize edilmiş görüntüsü .....	21
Şekil 3.5. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra gelişen rekombinant plazmitlerini taşıyan kolonilerin görüntüsü .....	24
Şekil 3.6. Anaç deneme parselinin görüntüsü.....	27
Şekil 3.7. Epidemiyolojik çalışmalarda kullanılacak PPV'den ari ve PPV'e duyarlı ve tolerant olarak bilinen farklı anaçlarla kurulmuş parselin deneme deseni .....	27
Şekil 3.8. Ergin kanatlı afit popülasyonunun belirlenmesi amacıyla anaç sürgünlerinin yapışkan bitki metoduna göre spreyleneceği ..... 31	31
Şekil 3.9. Yaprak bitlerinin ependorf tüpün tabanıyla membran (3 MM Whatman) üzerine ezilerek (solda) pens yardımı ile ependorf tüp içerisine alınması .....	32
Şekil 4.1. Mekanik inokulasyon yöntemiyle PPV-T ile enfekte edilen <i>Nicotiana benthamiana</i> bitkisinin yaprak damarlarında gözlenen bantlaşma, damar aralarında renk açılmaları ve kabartılar ve bu bitkide virüsün hareketliliğinin izlenmesi amacıyla disklerin alınması .....	36
Şekil 4.3. PCR ürünlerinin %1,5 lik agaroz jelde görüntülenmesi sonucu elde edilmiş jel görüntüsü (Çukurların üzerinde belirtilen rakamlar saflaştırılmış <i>E. coli</i> bakterilerinin çizgi şeklindeki tek kolonilerden alınmış örneklerdir. Su: Negatif kontrol olarak, YM1: Pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.).....	38
Şekil 4.4. Anaç deneme parselinden toplanan Şarka semptomu gösteren anaç yaprak örnekleri.....	40
Şekil 4.5. Anaç deneme parselinin bulunduğu enfeksiyon kaynağı olan bahçedeki Prunus ağaçlarında alınan örneklerin koordinatları (B13 kodu anaç deneme parselini simgelemektedir, B14 (erik), B15 (şeftali), B16 (erik), B12 (kayısı), B4 (erik) ve B7 (kayısı)). .....	41
Şekil 4.6. Anaç deneme parselinin bulunduğu enfeksiyon kaynağı olan bahçedeki Prunus ağaçlarında Şarka semptomu görüntüleri (B4 (erik), B7 (kayısı), B12 (kayısı), B14 (erik), B15 (şeftali) ve B16 (erik)). .....	42
Şekil 4.7. Deneysel anaç parselinde bulunan <i>Prunus spp.</i> anaçlarının DAS –ELISA ile testlenmesi sonucu pozitif bulunan Nemaguard ve Myrobolan anaçlarına ait bitki örneklerinin görsel değerlendirilmesi (P:Pozitif kontrol, N: Negatif kontrol) .....	43
Şekil 4.8. Deneysel anaç parselinde bulunan <i>Prunus spp.</i> anaçlarının DAS–ELISA ile testlenmesi sonucu pozitif bulunan Nemaguard ve Myrobolan anaçlarına ait farklı bitki örneklerinin görsel değerlendirilmesi (P:Pozitif kontrol, N: Negatif kontrol) .....	44
Şekil 4.9. PPV'ye spesifik P1/P2 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen RT-PCR analizi sonucuna göre DAS ELISA testinde pozitif çıkan anaçların hepsi pozitif reaksiyon göstermiştir. (1: Markör, 2: N108, 3: N 65, 4: N 148, 5: N 18, 6: N44, 7: N45, 8: C58 9: C44, 10: KNT +, 11: B 72, 12: C65, 13:	

B15, 14: Negatif kontrol, 15: Pozitif Kontrol) (N: Nemaguard, C: Myrobalan 29C, B: Myrobalan 29B) .....	44
Şekil 4.10. Deneme parselinde PPV ile bulaşık olduğu belirlenen Nemaguard, Myrobalan 29B ve Myrobalan 29C anaçlarının BLAST analiz sonuçları.....	54
Şekil 4.11. Anaç deneme parseli etrafında PPV ile bulaşık olduğu belirlenen Prunus türlerinin BLAST analiz sonuçları .....	60
Şekil 4.12. PPV ile enfekteli bahçenin yanında bulunan anaç deneme parselinde farklı anaç türlerinden yapışkan sürgün yöntemine göre 2015 ve 2016 yıllarında ilkbahar ve yaz aylarında her hafta toplanan farklı afit türlerinin ortalama sayısı. ....	62
Şekil 4.13. Real-time RT-PCR ile PPV tespit edilen <i>Myzus persicae</i> örneklerinin bir kısmının DNA amplifikasyon eğrisi.....	67
Şekil 4.14. Real-time RT-PCR ile PPV tespit edilen <i>A. spiraecola</i> örneklerinin bir kısmının DNA amplifikasyon eğrisi.....	68
Şekil 4. 15. Real-time RT-PCR ile PPV tespit edilen <i>H. pruni</i> örneklerinin bir kısmının DNA amplifikasyon eğrisi.....	69

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Yıllara göre dünyada sert çekirdekli meyve üretimi (Xing ve ark., 2017) ...	1
Çizelge 1.2. Yıllara göre Türkiye’de sert çekirdekli meyve üretimi (TÜİK, 2017) .....	2
Çizelge 3.1. Plazmite gen aktarımı için reaksiyon içeriği.....	23
Çizelge 3.2. Real-time RT-PCR reaksiyon karışımı (Roche LightCycler® 480 SYBR Green I).....	26
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan Real Time qPCR sıcaklık döngüleri .....	26
Çizelge 3.4. Plum pox virus’un tespitinde kullanılan Real Time RT-PCR primer dizileri.....	32
Çizelge 4.1. <i>N. benthamiana</i> bitkilerinde PPV-T ırkının ikinci ve dördüncü günde pozitif olarak belirlenen yaprak örneklerinin Real Time qPCR analiz sonuçları(CP: Crossing point(DNA çoğalmasının görünebilir olduğu ilk nokta)).....	37
Çizelge 4.2. Deneysel anaç parselinde bulunan farklı anaçların PPV açısından DAS-ELISA ve RT-PCR ile testlenmesi sonucu elde edilen sonuçlar.....	45
Çizelge 4.3. Deneysel anaç parselinden yapışkan sürgün metoduna göre her hafta toplanan farklı türlere ait afit sayısı ve oransal değerleri .....	63
Çizelge 4.4. 2015 yılında <i>in vitro</i> üretilen farklı anaçlardan toplanan afit türleri, sayıları ve PPV enfeksiyon oranları (enfekteli afit/testlenen toplam afit sayısı).....	64
Çizelge 4.5. 2016 yılında <i>in vitro</i> üretilen farklı anaçlardan toplanan afit türleri, sayıları ve PPV enfeksiyon oranları (Enfekteli afit/testlenen toplam afit sayısı).....	65
Çizelge 4.6. Real-time RT-PCR ile PPV tespit edilen <i>Myzus persicae</i> örneklerinin bir kısmının cihaz verilerine göre analiz sonuç raporu. ....	67
Çizelge 4.7. Real-time RT-PCR ile PPV tespit edilen <i>A. spiraeicola</i> örneklerinin bir kısmının cihaz verilerine göre analiz sonuç raporu. ....	68
Çizelge 4.8. Real-time RT-PCR ile PPV tespit edilen <i>H. pruni</i> örneklerinin bir kısmının cihaz verilerine göre analiz sonuç raporu .....	69

## 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

CP :	Coat protein
CT :	Threshold cycle
d <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O :	Çift destile su
DAS- ELISA :	Double antibody sandwich- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
DNA :	Deoksiribonükleik asit
dNTP :	Deoxynucleotide triphosphate
ELISA :	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPPO :	European and Mediterranean Plant Protection Organization
EtBr :	Etidyum bromid
FAO :	Food and Agriculture Organization of The United Nations
MgCl <sub>2</sub> :	Magnezyum klorür
PBS :	Phosphate buffer saline
PCR :	Polymerase Chain Reaction
pNPP :	p-nitrophenyl phosphate (nitrofenil fosfat)
PPV :	Plum pox virus
PVP :	Polyvinylpyrolidone
Real-time PCR :	Real-time polymerase chain reaction
Real-time qPCR:	Real-time quantitative polymerase chain reaction
RNA :	Ribonükleik asit
RT :	Reverse Transcription
TAE :	Tris-acetate-EDTA
TE :	Tris-EDTA
TÜİK :	Türkiye İstatistik Kurumu

## 1. GİRİŞ

Türkiye, dünya üzerinde uygun iklim kuşağına sahip olması nedeniyle tüm meyve türleri yetiştiriciliği açısından oldukça üstün ekolojik avantaja sahiptir (Ağaoğlu ve ark., 1997). Türkiye’de üreticiliği yapılan meyve türlerinin büyük bir kısmını sert çekirdekli meyveler oluşturmaktadır. Bunlar içerisinde kaysı, kiraz, erik, badem, şeftali, gibi türler yaygın olarak yetiştirilmektedir (Gül ve Akpınar, 2006).

Meyve yetiştiriciliğinde Prunus ailesi, diğer bir deyişle sert çekirdekli meyveler dünyada önemli bir ürün grubunu oluşturmaktadır. Türkiye, dünyada önemli sert çekirdekli meyve üreticisi ve ihracatçısı konumundadır. Özellikle dünya kurutmalık kayısı pazarının %70’ine Türkiye hakimdir (Çizelge1.1).

Çizelge 1.1. Yıllara göre dünyada sert çekirdekli meyve üretimi (Xing ve ark., 2017)

Ülke	Şeftali ve nektarin üretimi (10 <sup>4</sup> Ton / %)	Ülke	Erik Üretimi (10 <sup>4</sup> Ton / %)	Ülke	Kaysı Üretimi (10 <sup>4</sup> Ton / %)	Ülke	Kiraz Üretimi (10 <sup>4</sup> Ton / %)
Çin	1190.0/55.1	Çin	610.0/53.0	Çin	5.2/1.3	Çin	3.6/1.6
İtalya	140.2/6.5	Sırbistan	73.8/6.4	Türkiye	81.2/19.7	Türkiye	49.4/21.5
İspanya	133.0/6.2	Romanya	51.2/4.5	İran	45.7/11.1	Amerika	30.1/13.1
Amerika	96.5/4.5	Şili	30.6/2.7	Özbekistan	43.0/10.5	İran	20.0/8.7
Yunanistan	66.6/3.1	Türkiye	30.5/2.7	Cezayir	32.0/7.8	İtalya	13.1/5.7
Türkiye	63.8/3.0	İran	30.5/2.7	İtalya	19.8/4.8	Özbekistan	10.0/4.4

Ülkemizde sert çekirdekli meyve yetiştiriciliği ve üretim miktarı sürekli artış göstermektedir (TÜİK, 2017). Sert çekirdekli meyve türleri ülkemizin değişik bölgelerinde değişen yoğunlukta yetiştirilmektedir. Örneğin, Malatya ve civarı özellikle kuru kayısı yetiştiriciliğinde sadece ülkemiz için değil, dünya için en önemli bir bölgeyi oluştururken, bu durum göz önünde bulundurulduğunda Şarka hastalığı Türkiye kayısı tarımı ve buna bağlı endüstrisi için önemli bir tehdittir (Gürcan ve Yılmaz, 2012).



Çizelge 1.2. Yıllara göre Türkiye’de sert çekirdekli meyve üretimi (TÜİK, 2017)

Yıl	Şeftali Üretimi (Ton)	Erik Üretimi (Ton)	Kayısı Üretimi (Ton)	Kiraz Üretimi (Ton)
2012	611 165	300 046	760 000	470 887
2013	637 543	305 393	780 000	494 325
2014	608 513	265 490	270 000	445 556
2015	642 727	279 761	680 000	535 600
2016	674 136	297 589	730 000	599 650
2017	771 459	291 934	985 000	627 132

Plum pox virus (PPV)’ün neden olduğu şarka hastalığı, sert çekirdekli meyvelerin en önemli ve en yıkıcı viral hastalığıdır. 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. Cambra ve ark. (2006), tarafından yapılan bir araştırmada son 30 yıl boyunca şarka hastalığı yönetiminin tüm dünyadaki maliyetinin 10 milyar Avro’yu geçtiği hesaplanmaktadır.

PPV ilk olarak 1915 yılında Bulgaristan’da erik ağaçlarında görülmüş ve Atanasoff (1932) tarafından tanımlanmıştır. Bu nedenle, ilk PPV salgınları Doğu Avrupa’dan bildirilmiş ve ilerleyen yıllarda etmen kayısı (1933), şeftali (1961) ve vişnede de (1980) saptanmıştır (Sochor ve ark., 2012).

Batı Avrupa’da hastalığın ilerlemesi, II. Dünya Savaşından sonra; 1960’larda Almanya ve Avusturya’dan Hollanda, İsviçre, Yunanistan, İngiltere ve Türkiye’ye kadar; 1970’lerin başında Fransa, İtalya ve Belçika’da; 1980’lerin başında İspanya ve Portekiz’de; 1980’lerin sonlarında ise Mısır, Suriye ve Kıbrıs’da rapor edilmiştir. Şarka hastalığı Prunus türlerinin yetiştirildiği önemli ülkelerden sadece Avustralya, Yeni Zelanda, Güney Afrika ve ABD’nin Kaliforniya eyaletinde saptanamamıştır (Sochor ve ark., 2012).

Türkiye’de ise PPV’nin varlığı ilk olarak Marmara ve İç Anadolu Bölgelerinde bildirilmiştir (Sahtiyancı, 1968; Kurçman, 1973). Marmara bölgesinde 1968, İç Anadolu bölgesinde ise 1973 yıllarında saptanmış ancak yeni hastalık girişleri 1980’li yıllarda Ege, 2000’li yıllarda ise Akdeniz Bölgesin’de görülmüştür (Çağlayan ve ark. 2013).

Bu çalışmanın ise iki temel amacı bulunmaktadır. Birincil amacı ülkemize özgü bir ırk olan PPV-T ile deneysel olarak inokule edilmiş olan *Nicotiana benthamiana* ve GF 305 bitkilerinde virüsün bitki içinde yayılma durumunun kantitatif olarak belirlenmesi ve ikincil olarak da Kayseri ilinde PPV-T'nin doğal taşınma durumunun saptanmasıdır. Bu kapsamda çalışma iki çalışma paketi şeklinde yürütülmüştür:

Birinci çalışma paketinde PPV ile mekanik olarak inokule edilmiş olan *N. benthamiana* ve aşı yoluyla inokule edilen GF 305 bitkilerinde PPV-T'nin yayılmasını kantitatif olarak izlemek için Real-Time PCR analizleri yapılmıştır. Real-Time PCR optimizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra PPV-T ile inokule edilen *N. benthamiana* ve GF 305 bitkilerinde inokulasyon yapılan bölgeden virüsün bitkinin diğer bölgelerine ilerlemesi simptomolojik olarak ve Real-Time PCR yöntemiyle değerlendirilmiştir. Bu çalışma ile deneysel indikatör bitkilerde PPV-T ırkının hangi hızda yayıldığını ve yayılma sürecinde otsu-odunsu indikatör bitkilerde oluşturacağı semptom şiddetinin gözlenmesi ve moleküler testlerle doğrulanması amaçlanmıştır.

İkinci çalışma paketinde ise PPV'nin epidemiyolojisi çalışmalarında Kayseri ilinde doğal enfekteli kayısı, erik ve şeftali karışık dikim yapılmış bir bahçe seçilerek öncelikle bu bahçedeki enfeksiyon oranı saptanmıştır. Seçilen bölgede PPV-T'nin doğal taşınma durumunu ortaya koymak amacıyla seçilen bu bahçenin kenarına PPV'ye duyarlı ve tolerant olduğu bilinen PPV'den ari anaçlar dikilerek 3 yıl boyunca gözlenmiş ve DAS ELISA ve RT-PCR yöntemleriyle testlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda doğal enfeksiyon koşullarında PPV-T'nin sağlıklı anaçlara taşınma oranı, taşınmada önemli rol oynayan afit türlerinin belirlenmesi ve PPV-T ırkına hassas ve tolerant anaç türlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

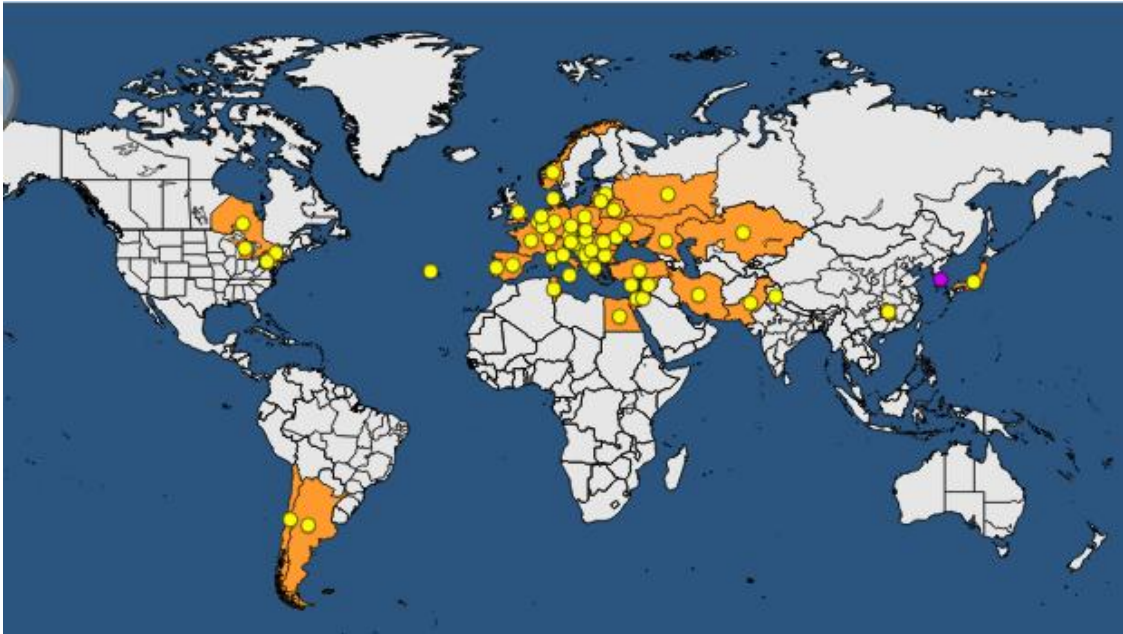
## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Şarka hastalığına neden olan Plum pox virus (PPV) *Potyviriidae* familyasına bağlı *Potyvirus* cinsinin bir üyesidir. Hastalık etmeni ipliksi yapıda, esnek, 660-770X12 nm boyutlarında olup, genom tek sarmal RNA'dan oluşmuştur (Agrios, 2005). Etmenin, biyolojik, serolojik, moleküler ve epidemiolojik özelliklerine göre 10 farklı ırkı bulunmaktadır. Bunlar; PPV-M (Marcus), PPV-D (Dideron), PPV-Rec (recombinant), PPV-EA (El Amar), PPV-C (Cherry), PPV-T (Turkey), PPV-W (Winona), PPV-CR (Cherry Russian), PPV-An, PPV-CV (Cherry Volga) (Kerlan ve Dunez, 1979; Ulubaş Serce ve ark., 2011; Sochor ve ark., 2012; Palmisano ve ark., 2012; Glasa ve ark., 2013; Chirkov ve ark., 2018).

PPV ile ilgili yapılan çalışmalarda Kerlan ve Dunez (1979) tarafından ilk olarak -M (Marcus) ve -D (Dideron) ırkları bildirilmiştir. Kayısı ve eriklerde yaygın olmasına rağmen doğal inokulum koşullarında şeftalilerde daha az rastlanan -D ırkının ilk olarak Avrupada; -M ırkının ise Orta ve Güney Avrupa'da yaygın olduğu bildirilmiştir (Damsteegt ve ark., 2001; Maejima ve ark., 2011; Glasa ve ark., 2013). PPV-M ırkı şeftali ağaçlarında şiddetli epidemilere neden olmasıyla birlikte, aktif bir şekilde afitlerle taşınmaktadır (Capote ve ark., 2008; Dallot ve ark., 2001). PPV-EA (El Amar), Mısır'da kayısı, Şeftali ve Japon eriklerinde (Matic ve ark., 2006; Youssef ve Shalaby, 2006); PPV-C (cherry) vişne ve kirazda Moldova, İtalya, Macaristan, Belarus ve Hırvatistan'da (Nemchinov ve Hadidi, 1996; Crescenzi ve ark., 1997; Fanigliulo ve ark., 2003) tespit edilmiştir. PPV-M ve PPV-D ırkına genetik benzerlik gösteren PPV-Rec (Recombinant) ırkı birçok Avrupa ülkesinde, Avrupa'nın dışındaki ülkelerde ve Türkiye'de erik ve kayısı ağaçlarında rapor edilmiştir (Garcia ve ark., 2014; Candresse ve ark., 2007; Lowery ve ark., 2015). PPV-Rec ırkının etkin bir şekilde afitlerle taşındığı belirlenmiştir (Glasa ve ark., 2004). Geniş dağılım ve yaygınlığı göz önüne alındığında, PPV-Rec ırkı, -M ve -D ırklarından sonra en önemli ırk olarak kabul edilmektedir. Farklı bir ırk olan ve PPV-W (Winona) ırkının tespit edilmesine temel oluşturan PPV-W3174 izolatu orijinal olarak ilk kez 2003 yılında James ve Varga (2005), tarafından Kanada'da eriklerde; daha sonra Letonya, Ukrayna ve Rusya'da tespit edilmiştir (Glasa ve ark., 2011; Mavrodieva ve ark., 2013). Açık arazide erik, Kanada eriği, kiraz eriği ve tüylü kirazların PPV-W ile bulaşık olduğu belirlenmiştir

(Mavrodieva ve ark., 2013). PPV-CR (Cherry Russian), Rusya'da (Glasa ve ark., 2013); PPV-An Arnavutluk'ta (Palmisano ve ark.,2012); PPV-CV (Cherry Volga) Rusya'da kiraz ağaçlarında (Chirkov ve ark., 2018) tespit edilmiştir (Şekil 2.1).

İlk olarak Türkiye'de kayısı, şeftali ve erikte tespit edilen PPV-T (Turkey) ülkemize özgü bir ırktır (Ulubaş ve ark., 2009). Son yıllarda Arnavutluk'da eriklerde tespit edilen bir PPV izolatının Türkiye ırkı ile çok benzer olmasına karşın evrimsel süreçte Marcus ırkının potansiyel atası olabileceği düşünülmüş ve ayrı bir ırk olarak PPV-An (Ancestor Marcus) olarak isimlendirilmiştir (Palmisano ve ark., 2012; James ve ark., 2013; Garcia ve ark., 2014).



Şekil 2.1. Plum pox virus ırklarının Dünya'daki dağılımı (EPPO, 2019)

## 2.1. Türkiye'de PPV Irk Dağılımı ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

Ülkemizde ırk dağılımı ile ilgili yapılan araştırmalarda Marmara (Çanakkale) ve Akdeniz (Adana, Mersin ve Hatay) Bölgelerinde nektarin, şeftali ve kayısı ağaçlarında PPV-M ırkı, Ankara'da kayısı ve eriklerde -M ırkı ile birlikte -D, ırkı Isparta'da eriklerde Rec ırkı, Orta Anadolu (Ankara) ve Ege Bölgesi (İzmir)'nde ise -T ırkı saptanmıştır (Ulubaş ve ark. 2009). Bu durumda; eski yıllardan beri enfekteli olduğu bilinen bölgelerde PPV-T, son yıllarda enfeksiyonun saptandığı bölgelerde ise PPV-M ırkı olduğunu göstermektedir (Çağlayan ve ark., 2013).

Gürcan ve ark., (2013b)'nin İç Anadolu Bölgesi'nde yaptıkları bir çalışmada Ortaköy, Aksaray şehir merkezleri ve ilçelerinden toplanan simptomatik kayısı ve erik ağaçlarında DASI-ELISA ve RT-PCR analizleri sonucunda PPV-D ırkı bulunmuştur. Bu çalışma ile ülkemizde ilk kez PPV-D ırkı ilk kez tek başına saptanmıştır.

Ceylan ve ark. (2013a), Yunanistan ve İtalya'dan getirilen üretim materyalleri ile yeni kurulan ticari şeftali ve erik bahçelerinde ve ev bahçelerinde PPV'nin bulunma durumunu araştırmışlardır. Birbirine uzak dört ilden (Çanakkale, Hatay, Isparta ve Kayseri) 10'ar örnek toplanmıştır. Yapılan testlemeler sonucunda yeni kurulan bahçelerde PPV-M ırkının; ev bahçelerinde ise PPV-T ırkının yaygınlığı tespit edilmiştir.

PPV-T ırkının İç Anadolu bölgesinde yaygınlığını belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada Ankara, Kayseri, Konya, Aksaray, Nevşehir, Yozgat ve civarlarındaki yerleşim yerlerinden 120 örnek toplanmış ve DASI-ELISA (Double Antibody Sandwich Indirect-ELISA) ve RT-PCR yöntemleri ile testlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda Ankara, Kayseri ve Konya'da PPV enfeksiyonu bulunmuştur. Bu üç il arasında en yüksek bulaşıklık oranı Ankara'da bulunurken Aksaray, Nevşehir ve Yozgat şehir merkezlerinde enfeksiyona rastlanmamıştır. GenBankasında kayıtlı PPV dizileri ile yapılan karşılaştırmalar sonucunda bütün örneklerin PPV-T ırkı olduğu belirlenmiştir. Hiçbir şeftali, badem ve kiraz ağacında enfeksiyona rastlanmamıştır. Bu da PPV-T ırkının çoğunlukla kayısı ve bazı erik çeşitlerini enfekte ettiğini göstermiştir (Gürcan ve ark. 2013a).

Kayseri'de PPV enfeksiyon oranını belirlemek için yapılan bir çalışmada Kayseri il merkezinde 53, Yahyalı'da ise 10 ağaçtan örnek toplanmıştır. DASI-ELISA ve RT-PCR analizleri ile örneklerde virüsün varlığı testlenmiştir. RT PCR çalışmaları sonucunda Kayseri il merkezinde 47 örneğin PPV ile bulaşık olduğu (%89) ve toplanan tüm izolatların PPV-M ırkı olduğu bildirilmiştir. Serolojik testlemelerde ise 33 örnek -M spesifik antiserumun yanı sıra -D spesifik antiserum ile de reaksiyon göstermiştir. Benzer durumlarda yapılan detaylı çalışmalar böyle izolatların PPV-T (Turkey) olabileceğini göstermiştir. Hastalık Yahyalı ilçesindeki bir erik bahçesinde ilk defa tespit edilmiştir. Kayseri il merkezindeki sert çekirdekli ağaçların Şarka ile yoğun olarak enfekteli olduğu belirlenmiş ve dolayısıyla hastalığın Kayseri il merkezinde uzun süredir var olduğu sonucuna varılmıştır (Ceylan ve ark., 2013b).

Gürcan ve Ceylan (2016) tarafından yapılan ırk dağılımı ile ilgili çalışmada toplanan 612 örneğin 314 tanesinin PPV pozitif olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın sonucuna göre -D ve -T ırkının daha çok ev bahçelerinde; -M ırkının kapama meyve bahçelerinde bulunduğu belirtilmiştir. Bursa'dan toplanan örneklerden bir tanesinde -Rec ırkının olduğu rapor edilmiştir. (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Plum pox virüs ırklarının Türkiye'deki dağılımı (Gürcan ve Ceylan, 2016)

## 2.2. Plum pox virüs İrklarının Konukçu Bitki İçerisinde Hareketi ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

Kayısı ağaçları bu etmenin birçok ırkının konukçusu olmakla birlikte, duyarlılık açısından çeşitler arasında farklılıklar görülmektedir. Belirtiler, yapraklarda ikincil damarların çevresinde dağınık çizgi ve hale şeklinde olup, ağacın iç kısmındaki bazı yapraklarda vejetasyon boyunca kaybolmayabilir. Kayısı meyvelerindeki belirtiler, parlak sarı halkalar veya çekirdeğe kadar ulaşan derin yaralar şeklinde olabilmektedir. Çekirdek üzerinde sarı veya krem rengi halkalarla çevrili koyu noktalar Şarkanın tipik belirtilerindendir. Duyarlı erik çeşitlerinin yapraklarında, damarlar boyunca renk açılmaları görülür, meyve etinde yaralar oluşur, meyveler olgunlaşmadan dökülür. Meyveler acı veya tatsız olmasından dolayı pazar değerini yitirir. Şeftali çeşitlerinde tomurcuk dökülmesi ve taç yapraklarda pembemsi çizgiler oluşmasına neden olur. Duyarlı çeşitlerde yaprak belirtileri ilkbaharda hemen ortaya çıkar. Yaprakların ikincil

ve üçüncül damarları boyunca sararma veya yaprak kenarlarına doğru sarımsı benekler ve haleler şeklinde görülür. Yaprak belirtileri çok tipik olup, alışkın bir göz kolayca tanıyabilir (Agrios, 2005; Anonim, 2008; Sochor ve ark., 2012).

Bitkileri sistemik olarak enfekte eden virüslerin organizma seviyesinde taşınması, değişik tip hücrelerden ve dokulardan geçmesini gerektirir. Eğer enfeksiyon epidermal hücrelerden başlarsa, bunun ardından virüsün mezofilden floem parankiması ve komşu hücrelerine geçmesi gerekir. Enfeksiyonun başlangıç noktasından diğer yapraklara uzun mesafeli taşınma ise, iletim demetlerinde fotosentez ürünleri ile birlikte kalburlu borulardan (floem) kitlesel olarak hızla taşınma şeklinde gerçekleşir. Sistemik dokularda gerçekleşen bu taşınma sonunda enfeksiyon noktasından uzaklaşan virüs, ulaştığı noktada, plazmodezma yoluyla hücreden hücreye taşınır. Virüsün bitki içinde yayılışı virüs ve bitki türüne bağlı olarak değişir. Bitki virüslerinin sistemik enfeksiyonu, her birinde yer alan viral ve konukçu faktörler arasındaki uyumlu etkileşime bağlıdır (Topkaya ve Ertunç, 2017).

PPV-D ırkının duyarlı ve dayanıklı kayısı çeşitlerinde bitki içerisinde hareketinin incelendiği bir çalışmada, PPV inoküle edilmiş anaçlar üzerine aşılardan duyarlı çeşitlerde bitki içerisinde uzun mesafede taşınması ve simptom gözlemlenmesi mümkün olurken; dayanıklı çeşitlerin PPV'nin uzun mesafelere taşınmasına izin vermediği belirlenmiştir. Virüsün ksilem ve bazende korteks tabakasında lokalize olduğunu, ayrıca bütün kültürlerin virüsün belirli bir yere kadar hareketine izin verdiği ancak duyarlı çeşitlerde uzun mesafelere taşınabildiğini bildirmişlerdir (Dicenta ve ark., 2003).

PPV-D nin odunsu bitkilerde uzun ve kısa mesafede hareketinin bitkilerin duyarlı olması ya da dayanıklı olması ile ilgili ilişkisinin belirlenmesi amacıyla Rubio ve ark. (2008) tarafından yapılan araştırmada deneme iki farklı şekilde kurulmuştur. Birinci yöntemde GF 305 indikatör bitkisine kabuk aşısı ile PPV-D inoküle edilmiş ve daha sonra 'Real Fino' ve 'Stark Early Orange' kayısı genotipleri aşılansın; aşı kalemlerinin üzerine de tekrar GF 305 aşısı kalemi ile aşı yapılmıştır. İkinci yöntemde ise sağlıklı GF 305 bitkisi üzerine 'Real Fino' ve 'Stark Early Orange' kayısı genotipleri doğrudan aşılansın; aşı kalemlerinin üzerine PPV-D ile bulaşık GF 305 aşısı kalemi ile aşı yapılmış ve virüsün ksilem ve floemde hareketi gözlemlenmiştir. Dayanıklı genotip olan Stark Early Orange'ın her iki yöntemde de virüsün bitki içinde ilerlemesini engellediği

belirlenmiştir. Bu çalışma ile PPV'nin bitkide uzun mesafede taşınmasının nasıl gerçekleştiği belirlenirken dayanıklılık çalışmaları için yeni bir yöntem önerilmiştir.

### **2.3. Plum pox virus'un Vektör Afit Türleri ile Taşınması ve Vektör Bünyesinde Virüsün Varlığının Belirlenmesi ile İlgili Çalışmalar**

Şarka hastalığının uzun mesafede yayılması, enfekteli fidan ve gözlerin bir bölgeden başka bir bölgeye transferi ile olmaktadır. Hastalığın yayılımı kısa mesafede ise yaprak bitleriyle (*Aphis craccivora*, *A. spiraecola*, *Brachycaudus helichrysi*, *B. cardui*, *Myzus persicae*, *M. varinas*, *M. (Phrodon) humuli*) gerçekleşmektedir. Yaprak bitleri bir yaprak veya meyve yüzeyini beslenmek amacıyla ziyaret ettiğinde sitiletini dokuya batırmakta ve hücre içeriğini bünyesine almaktadır. Bu işlemi 30 saniye kadar kısa bir sürede yapmakta ve bu beslenme sırasında virüs partikülleri sitilet üzerine alınabilmektedir. Virüs partikülleri sitilette 1-3 saate kadar kalabilmektedir. Bu süreçte virüs sağlıklı bitkilere afitin beslenme faaliyetleri ile aktarılabilmektedir (Isac ve ark., 1998).

Afitler PPV'nin epidemiyolojisinde önemli rol oynamaktadır. PPV'nin afitle taşınmasının bir sonucu olarak 5 yıl içerisinde bulaşıklık oranı %10 dan %100'e ulaşabilmektedir (Gottwald ve ark., 1995; Varveri, 2006). Şarka hastalığının görüldüğü bölgelerde virulent afit oranının belirlenmesi hastalık kontrolü için stratejiler geliştirmek amacıyla çok önemlidir (Kimura ve ark., 2016).

PPV'nin, kantitatif analizlerinde ve özellikle afitlerin bünyesinde PPV'nin saptanabilmesi amacıyla Real-Time RT-PCR yöntemi başarıyla kullanılabilmektedir. Real Time PCR ile SYBR Green I erime eğrisi analizi çeşitli patojenlerin tanımlanması ve belirlenmesi için basit ve güvenilir bir yöntemdir (Varga ve James, 2006). SYBR Green I boyası DNA'ya spesifik olmayan bir şekilde bağlanma gösterebilmektedir. Bu uygulamada, floresans artışı her zaman spesifik amplifikasyonu göstermeyebilir. Çünkü çift sarmal DNA'ya entegre olan SYBR Green I ortamda hedef moleküller olmadığında primerlerin kendi aralarında gerçekleşecek olan bağlanmalar (primer dimer) sonucunda da yapıya katılarak floresans oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu olumsuz faktörü gidermek için amplifikasyon ürünlerinin "erime eğrisi" analizi yapılmaktadır (Anonim, 2006).



TaqMan sisteminde, 5' ve 3' uçlarından florokrom (floresans veren) maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Probu 5' ucunda bildirici (reporter) florokrom (6-carboxyfluorescein= 6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı (quencher) florokrom (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine=TAMRA) bulunmaktadır. Prob, tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Proba hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her siklusta üretilen ampikon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır (Anonim, 2006).

Ampikon uzunlukları sırasıyla 114 ve 380 bp olan PPV-D ve -M ırklarını spesifik olarak saptamak amacıyla SYBR Green I boyası kullanılarak yapılan erime eğrisi analizlerinin multipleks Real Time PCR çalışmasına göre hızlı ve güvenilir bir analiz yöntemi olduğu bulunmuştur (Varga ve James, 2005). Bu çalışmalarda farklı ırkların belirlenmesinde erime eğrisi sıcaklığı farklılık göstermiştir. Örneğin -D ırkı için  $T_{ms}$ : 84,1–84,43°C ve -M ırkı için  $T_{ms}$ : 85,34–86,11°C olarak belirlenmiştir. Bu işlem PPV'nin hem otsu konukçusu hem de odunsu konukçusu için uygulanmış sonucunda ırklar için erime sıcaklığı konukçuya göre değişiklik göstermemiştir. Çalışmada 74 bp büyüklüğünde bütün ırklar tanıyan primerler (PPV-P1 – ACCGAGACCACTACTCCC; PPV-U – TGAAGGCAGCAGCATTGAGA; PPV-FD – TCAACGACACCCGTACGGGC; PPV-FM – GGTGCATCGAAAACGGAACG; Nad5-F – GATGCTTCTTGGGGCTTCTT GTT; PPV-RR – CTCTTCTTGTGTTCCGACGTTTC; Nad5-R – CTCCAGTCACCAACA TTGGCATAA; PPVRR-LUX FAM GAAACGCTCTTCTTGTGTTCCGACGT5TC; Nad5F-LUX FAM GAACAAGTGCTTCTTGGGGCTTCTTG5TC) kullanılmıştır. Bu fragman uzunluğu 80,12 – 81,52°C erime eğrisi sıcaklığı için PPV ırklarını tanımlamada uygun bir ampikondur. Bu çalışmada SYBR Green I ve LUX primer karşılaştırması yapılmıştır ve SYBR Green I ile yapılan analizlerde erime eğrisi pikleri LUX primerle yapılan analizlere göre daha iyi sonuç vermiştir. Bunun sonucu olarak PPV ırklarını tanımlamada SYBR Green I daha güvenilir bulunmuştur. SYBR Green I

analizi diğer analizlere göre nispeten ucuz ve diğer elektroforetik yöntemlerdeki ethidium bromide kullanımına ihtiyaç duyulmaması ile basit bir uygulama olarak belirlenmiştir (Varga ve James, 2005).

Varga ve James (2006) tarafından yapılan bir çalışmada 74 bp ampliconun Real-Time RT-PCR ve SYBR Green I erime eğrisi analizi PPV C, -EA ve -W ırklarının tanımlanmasını da mümkün kılmıştır. 155 bp amplicon ile yaptıkları çalışmadan etkili sonuç alamadıkları için modifiye etmişler ve birtakım değişiklikler önermişlerdir. Bunlar; 1) DNA üretiminde tek tüp reaksiyonundan dithiothreitol kaldırıldığı zaman iki tüp protokolü ile aynı hassaslıkta sonuç vermiştir 2) Daha yavaş erime oranının örneğin 0,1°C/s nin 0,4°C/s ye göre zayıf ampliconların tanımlanmasında ve ard arda gelen amplicasyonların çözünürlüğünün daha iyi olmasında daha verimli olduğu belirtilmiştir. SYBR Green I'ı ikili erime eğrisi analizleri için uygun bulmuşlardır.

Olmos ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada PPV'nin ana ırklarından olan -D ve -M'yi sayısal olarak analiz edebilmek için hassas Taq Man kimyasallarına dayanan Real Time RT-PCR geliştirilmiştir. Primer ve prop dizaynı için universal P1 ve P2 (Wetzel ve ark., 1991) primerleri arasında kalan nükleotit dizisi seçilmiştir. GeneBank, ENSEMBL ve DDBJ veri tabanlarından elde edilen 59 nükleotitlik PPV dizilerinin DNA dizi analizleri yapılmıştır. Optimal oligo dizisi primer express (ABI) kullanılarak elde edilmiştir. Primerler P241 (5-CGT TTA TTTGGC TTG GAT GGA A-3), P316D (5-GAT TAA CAT CACCAG CGG TGT G-3) ve P316M (5-GAT TCA CGT CACCAG CGG TGT G-3) amplifikasyon sonrası 76 bp DNA fragmenti oluşturmuştur. Taq Man probu PPV-DM (5-CGT CGGAAC ACA AGA AGA GGA CAC AGA-3) 5' ucunda FAM, 3' ucunda TAMRA ile işaretlenmiştir. Real-Time PCR primerlerini de içeren 243 baz çiftlik spesifik PPV nükleotid dizisi RT-PCR kullanılarak çoğaltılmış ve pGEM-T vektörüne aktararak JM 109 *E. coli* bakterisinde klonlanmıştır. Transforme alanlar ampliconun direncine göre ve T7 ile P1 primerleri kullanılarak yapılan PCR ile gösterilmiştir (Wetzel ve ark., 1991). Plasmid Not 1 bölgesinde linearize edilmiş ve Megascrit T7 kiti kullanılarak yapılan *in vitro* transkripsiyon reaksiyonunda hedef olarak kullanılmıştır ve takiben DNase 1 enzimi ile 37°C'de 30 dk muamele edilmiştir. 304 nükleotitlik RNA'nın sentezi (243 nükleotit PPV+63 bazlık pGem-T (vektör) %2 lik agaroz jelde elektroforezle görüntülenmiştir. RNA fenol kloroform ekstraksiyonu ve etanol çöktürme yöntemiyle saflaştırılmıştır.

RNA miktarı UV densitometri kullanılarak  $\mu\text{g}$  olarak ölçülmüştür. Tek zincirli RNA'nın mikrogram olarak pikomole dönüştürülmesi ribonükleotidin (340 Da) moleküler ağırlığı ve transkriptin baz sayısı göz önünde bulundurularak yapılmıştır.  $\text{ssRNA} = \mu\text{g}$  (ssRNA)'ın  $\times (10^6 \text{ pg/1g}) \times (1 \text{ pmol/340 pg}) \times (1/\text{Nb})$ . Avogadro sabiti (Avogadro, 1811) transkript sayısını tahmin etmekte kullanılmıştır ( $6.023 \times 10^{23}$  molecules/mol). Transkript sayısı her  $5\mu\text{l}$  için hesaplanmış ve her kantitatif Real Time RT-PCR reaksiyonu için standart olarak kullanılmıştır. 10 kez seyreltilmiş seri seyreltik  $4 \times 10^{12}$  den  $4 \times 10^0$  kadar hazırlanmış tüplere dağıtılmış ve kullanılıncaya kadar  $-80^\circ\text{C}$  de saklanmıştır.  $4 \times 10^8$  den  $4 \times 10^0$  kadar olan seyreltikler standart eğriyi oluşturmak için kullanılmıştır. Taq Man analizi qPCR ABI 7000 Prism cihazında yapılmıştır. Reaksiyon kokteyli 1X Taq Man universal master miksi (ABI), 1X MultiScribe ve RNase Inhibitor karışımı (ABI),  $1\mu\text{M}$  primer P241,  $0,5\mu\text{M}$  primer P316D,  $0,5\mu\text{M}$  primer P316M ve  $200\text{Nm}$  Taq Man probu ve  $5\mu\text{l}$  örnek içermektedir. RT-PCR protokolü bir adım  $48^\circ\text{C}$  30 dk ve  $95^\circ\text{C}$  10 dk ve takiben 40 döngü  $95^\circ\text{C}$  15 sn ve  $60^\circ\text{C}$  1 dk şeklindedir. Veri kontrolü ve analizi ABI Prism 7000 programı kullanılarak yapılmıştır. Standart eşik makine tarafından kabul edilen değerdir. 10 seyreltik çözelti 4 teknik tekrar biçiminde Real-Time PCR'in hassasiyetini ve güvenilirliğini test etmek için yapılmıştır. Dört transkript kopyasını tanımlayacak reaksiyon olsa da kantifikasyon 40 kopyadan  $4 \times 10^8$  kopyaya kadar tanımlanmıştır. Metot enfekte *N. benthamiana* bitkilerinden elde edilen D 3.3 RB/Nb (NAT) PPV izolatını sağlıklılara bulaştırdıktan sonra ondan elde edilen ekstraktlar üzerinde yapılmıştır. Bitki ekstraktları bireysel plastik torbalar içerisinde 1:10 (w/v) PBS'de, pH 7.2, 2% (w/v) PVP-10 ile desteklenmiş ve 0.2% (w/v) DIECA ile ezilmesiyle hazırlanmıştır (Cambra ve ark., 1994). Viral RNA RNeasy bitki minikiti (Qiagen) ile her bireyden küçük modifikasyonlar (Bertolini ve ark., 2001) yapılarak izole edilmiştir. Özetle  $200\mu\text{l}$  bitki ekstraktı  $350\mu\text{l}$  RLT buffer ile karıştırılmış ve lysate QIAshredder kolona aktarılmış ve filtrenin altına geçen kısım alınmıştır. Saf etanol yarım hacim olarak lizota eklenmiş ve karışım RNeasy spin kolona aktarılmıştır. RW1 ve RPE tampon çözelti ile yıkandıktan sonra  $50\mu\text{l}$  RNase'dan arı su ile seyreltilmiş ve  $-20^\circ\text{C}$ 'de kullanılıncaya kadar saklanmıştır. Real Time RT-PCR güvenilirliği bitki materyali için her örneğin 3 kez ölçülmesiyle sağlanmıştır. Transkriptlerden elde edilen standart eğrinin uygunluğu en hassas PPV hedef kantifikasyonu için standardın ve arazi örneklerinin amplifikasyon verimliliği

Rasmussen (2001)'e göre karşılaştırılmıştır. Kalibrasyon eğrisinin verimliliği aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:  $slope = -1/\log(\text{efficiency})$ . Verimlilik, transkriptler ve arazi örnekleri için sırasıyla 1,93 ve 1,92 olarak saptanmıştır. Real Time RT-PCR hassasiyeti monoklonal antibody (5B-IVIA) kullanıldığı DASI ELISA (Cambra ve ark., 1994), konvensiyon RT-PCR (Candresse ve ark., 1995) ve nested PCR ile karşılaştırılmıştır (Olmos ve ark., 2003). Farklı yöntemlerden elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında Real Time RT-PCR 1:32, 768.000 seyreltme ile en hassas metod olarak bulunmuştur (Olmos ve ark., 2005).

Afit vektörleri ile non-persistent taşınan virüsleri tanımlamaya yarayan PCR tabanlı analizlerin kullanılabilirliğini gösteren çok az çalışma bulunmaktadır (Olmos ve ark., 1997; Cambra ve ark., 2004). Real-Time kantitatif RT-PCR yöntemi geniş dinamik bir kantifikasyonu olması nedeniyle nükleik asitlerin tanımlanmasında hassas bir metoddur. Bu yöntem afit bünyesinde bulunan non propagative ve sirkulatif virüslerin RNA kopya sayısını çıkarmak için kullanılmıştır (Fabre ve ark., 2003).

Dallot ve ark. (2001) tarafından yapılan bir çalışmada Fransa'da PPV-M ile enfekteli ağaçların bulunduğu bir şeftali bahçesinde PPV nin afit vektörlerle taşınması 7-10 yıllık bir süreç boyunca yeni simptom gösteren ağaçların takibi yapılarak incelenmiştir. %69-100 oranında enfekteli ağaçlar ilk 12 m, %79-100 oranında enfekteli ağaçlar 18 m de olduğu ve afitler tarafından virusun 12-75 metre mesafeye taşınabildiği belirlenmiştir. İspanya'da yapılan benzer bir çalışmada PPV-M ırkının doğal inokulum koşullarında 12 m mesafeye kadar taşındığı bildirilmiştir (Cambra ve ark., 2006).

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

PPV-T ve -M ırklarının doğal enfeksiyonunu belirlemek amacıyla 2010-2011 yıllarında İzmir ve Hatay'da yapılan çalışmalarda, doğal koşullarda afitlerle PPV-T ve -M ırklarının farklı *Prunus* anaçlarına taşınma ve enfeksiyon durumları belirlenmiştir. İzmir ilinde en yaygın afit türleri *M. persicae* (%20,15), *Hyalopterus pruni* (%18,64), *A. craccivora* (%9,04) olarak belirlenirken, Hatay'da *A. gossypii* (%20,55), *A. spiraecola* (%19,38), *H. pruni* (%13,36) olarak bulunmuştur. 2011 yılında yapılan analizler

sonucunda en yüksek virüs bulundurma oranını ise *M. persicae* göstermiştir (Çağlayan ve ark., 2013).

Hatay'ın Antakya ilçesinde doğal olarak PPV enfekteli nektarin bahçesinin yakınına sağlıklı Myrobolan 29C (*P. cerasifera*), Garnem (*P. dulcis* × [(*P. persica* × *P. davidiana*) × *P. persica*]), GF677 (*P. amygdalus* × *P. persica*), Docera 6 (*P. domestica* × *P. cerasifera*), Greenpac ((*P. persica* × *P. davidiana*) × (*P. dulcis* × *P. persica*)) ve Adesoto 101 (*P. 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, *A. gossypii* %24,56, *A. spiraecola* %22,60, *H. pruni* %22,22, *Macrosiphon euphorbiae* %20 ve *A. craccivora*'nın %8 oranlarında yaygın bulunduğu bildirilmiş, yapılan Real Time RT-PCR analizlerinde *A. spiraecola*'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).

Lowery ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada PPV taşınmasından sorumlu en etkili afit türünün *M. persicae* olduğu belirtilmiştir. Daha önce enfekte olmuş erik yapraklarından beslenen yaprak bitleri %36; enfekteli şeftali yapraklarından beslenen yaprak bitleri ise 18–28% oranında virüsü şeftali fidanlarına bulaştırmıştır. *Aphis spiraecola* (Patch) ile *M. persicae* kıyaslandığında; *A. spiraecola*'nın PPV taşınmasında daha az etkili olduğu ancak şeftalinin en hassas olduğu dönemlerde popülasyonunun daha yüksek olmasından dolayı PPV'nin yayılmasında daha etkili olduğu rapor edilmiştir.

Nisan 2011 ve Aralık 2012 tarihleri arasında Japonya'da PPV ile bulaşık bir bahçede afitlerin virusun epidemiyolojisindeki rolünün belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada her hafta 50 tane ergin afit test edilmiştir. Yaprak bitlerinin sayısı geçen yıla göre değişmekle birlikte, iki yıl boyunca saptanan beş baskın türden, *Aphis spiraecola* en çok tuzağa yapışan tür olarak bulunmuştur. PPV salgınlarından sorumlu olan en yaygın türler *A. spiraecola*, *A. craccivora*, *A. gossypii* ve *Rhopalosiphum maidis* olarak bulunmuş ancak, *A. spiraecola* epidemiyolojideki rolünün diğer türlere göre daha önemli olduğu belirtilmiştir (Kimura ve ark., 2016).

#### 2.4. Plum pox virüs'üne Karşı Anaç Duyarlılığının Belirlenmesi ile İlgili Çalışmalar

Plum pox virüs ile mücadele yöntemlerinden en önemlisi hastalıklı bitkilerin ivedilikle uzaklaştırılması ve yerine sağlıklı bitkilerin dikilmesidir. Ancak, dayanıklı yeni genotiplerin geliştirilmesi ve yeni dayanıklı kaynaklarının araştırılması sorunun en kesin çözümü olmaktadır (Kegler ve ark., 1996; Rubio ve ark., 2005). Kalem ve anaçların duyarlılık/dayanıklılık seviyeleri arasında olası bir ilişki olabileceği düşünülerek kayısı ve eriklerde birçok çalışma yürütülmüş fakat olumlu sonuç alınamamıştır (Sutic, 1999). Dragoiski ve ark. (2002) eriklerde farklı anaç-çeşit kombinasyonlarında hastalığın yayılma hızında farklılıklar gözlemiş ancak Blazek ve ark., (2003) bu bulguları teyit etmemiştir. Bir başka çalışmada ise anaç olarak kullanılan farklı sert çekirdekli bitki türleri ve melezlerinden kayısı, erik ve şeftalilerin (Myrobalan 29 C dışında) PPV'ye duyarlı olduğu ancak bir grup kiraz (*P. lannesiana*) ve badem melezlerinin (GF677) yüksek oranda tolerant olduğu bildirilmiştir (Rubio ve ark., 2005).

Çağlayan ve ark. (2004)'nın Türkiye'deki yerli kayısı ve erik çeşitlerinin PPV'ye reaksiyonu ile ilgili yaptıkları bir çalışmada doğal olarak PPV ile enfekteli olan 10 yıllık anaçlar üzerine yerli Türk kayısılarından Alyanak, Tokaloğlu, Hacıhaliloğlu, Soğancı, Hasanbey, şekerpare, Kabaası, Sakıt-2, tip 11/89 çeşidi, Çataloğlu, Çöloğlu, Mahmuduneriği, Hacıkız ve yerli eriklerden de Alerik, Can-2, Değirmendere, Aynalı, tip 1559 çeşidi, Papaz, Havran, Türbe çukuru, çeşitleri aşılannmıştır. Aşılannan bitkiler iki büyüme sezonu boyunca gözlemlenmiş ve RT-PCR analizi yapılmıştır. Sakıt-2, Aynalı, Havran çeşitleri PPV'ye oldukça hassas bulunurken eriklerden tip 1559 ve Papaz, kaysılardan ise tip 11/89 çeşidi PPV'ye tolerant bulunmuştur. En şiddetli semptomlar ise Aynalı erik çeşidi ile Sakıt-2 kayısı çeşidinde gözlenmiş ve bu gözlemler RT-PCR analizleriyle de doğrulanmıştır.

PPV'ye duyarlı ve dayanıklı anaçların (Adesoto 101, Mariana GF8-1, Cadaman ve Garnem) doğal inokulum koşullarında reaksiyonlarının belirlendiği bir çalışmada DAS-ELISA ve RT-PCR testlemeleri sonucunda Adesoto 101 ve Mariana GF8-1 anaçlarının PPV'ye çok duyarlı olduğu bulunurken, birkaç Cadaman ve Garnem anacınının da real-time RT-PCR testi sonucunda PPV ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir (Milusheva ve Bozhkova, 2013).

Doğal inokulum koşullarında PPV-T ırkının farklı anaçlara karşı duyarlılığının araştırıldığı bir çalışmada ise kullanılan *Prunus* anaçlarında (Nemaguard, Myrobalan *Prunus marianna* GF8.1, Docera 6, GF677 ve Garnem) yapılan testlemeler sonucunda %6,14 enfeksiyon oranı ile Myrobalan 29C ve %4,66 enfeksiyon oranı ile de Nemaguard PPV-T enfeksiyonuna en hassas anaçlar olarak bulunmuştur (Gazel ve ark., 2014).



### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. MATERYAL**

##### **3.1.1. Biyolojik İndeksleme**

Biyolojik indeksleme çalışmaları amacıyla *Nicotiana bentamiana* ve GF 305 bitkileri kullanılmıştır (Desvignes ve ark., 1999). İndeksleme çalışmalarında kaynak bitki olarak kullanılan PPV-T ile enfekteli *N. bentamiana* bitkisi ise Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Kahraman Gürcan'dan temin edilmiştir.

##### **3.1.2. Epidemiyolojik Çalışmalar**

Epidemiyolojik çalışmalarda PPV'ye duyarlı olduğu bilinen ve in vitro koşullarda üretilmiş olan 29 B ve C (*P. cerasifera*), Nemaguard (*P. persica* × *P. davidiana*), GF677 (*P. dulcis* × *P. persica*) ve tolerant olarak bilinen Garnem (*P. dulcis* × [(*P. persica* × *P. davidiana*) × *P. persica*]) anaçlarının her birinden 200 adet kullanılmıştır.

##### **3.1.3. Serolojik ve Moleküler Çalışmalar**

Serolojik ve moleküler çalışmalarda ana enfeksiyon kaynağı olarak Kayseri ilinde seçilen doğal enfekteli bir kayısı-erik-şeftali karışık dikim yapılmış bir bahçedeki PPV ile enfekteli ağaçların ve PPV'den ari olarak bahçe kenarına dikilen anaçların yaprak örnekleri ile bu anaçlardan toplanan olası vektör afitler kullanılmıştır. DAS-ELISA testi için kullanılan PPV antiserumları, BIOREBA (İsviçre) firmasından temin edilmiştir. ELISA'da 96 çukur içeren, çukurları düz tabanlı ve IgG absorbe etme özelliğindeki BIOREBA marka plakalar kullanılmıştır.

Real Time PCR çalışmaları için anaç deneme parselinden 2015 ve 2016 yıllarında toplanan PPV vektörü afitler ve PPV'nin bitki içerisinde hareketinin belirlenebilmesi amacıyla yapılan çalışmamızda kullanılan tütün bitkilerinden alınan örnekler kullanılmıştır.



## 3.2. YÖNTEM

### 3.2.1. Real-Time PCR Optimizasyonu ve *Nicotiana benthamiana* ile GF305 Bitkilerinde PPV'nin Hareketinin İncelenmesi

#### 3.2.1.1. *Nicotiana benthamiana* ve GF 305 Bitkilerinin Yetiştirilmesi

*N. benthamiana* bitkilerin yetiştirilmesinde torf, toprak ve kumdan oluşan karışım 1:1:1 oranında karıştırılarak kullanılmıştır. İndikatör bitki tohumları çimlenme sürecini tamamlayıncaya kadar ışık ve sıcaklık kontrolüne sahip iklim odasında tutulmuştur. Tohumların çimlenmesini takiben fideler 5-6 yapraklı döneme ulaştıklarında aynı karışım ile doldurulmuş 10 cm çapında ve 15 cm yüksekliğindeki plastik saksılara şaşırtılmıştır. Aynı ayrı saksılara şaşırtılan otsu test bitkileri +22-24°C sıcaklık, %60-70 orantılı nem ve 16/8 (aydınlık/karanlık) saat ışık periyodunda muhafaza edilmiştir.

Biyolojik indeksleme amacıyla odunsu indikatör bitki olarak kullanılacak GF 305 bitki tohumlarının soğuklama ihtiyaçlarının karşılanması, engelleyici etmenleri gidermek, tohum kabuğunu yumuşatmak, embriyonun su ve oksijen alımını kolaylaştırmak amacıyla tohumlar etüvde sterilize edilmiş torf, kum ve perlit içerisinde katlama işlemine tabi tutularak +4°C de bir yıl bekletilmiştir. Bu süreç sonucunda ekimi yapılan tohumların hepsi çimlenmiş ancak PPV inokulasyonu yapılacak döneme gelmeden GF 305 anaçlarında kuruma gözlemlenmiştir. Daha sonra farklı yöntemler kullanılarak birkaç kez tohumun çimlenmesi sağlanmış ama anaçların yeteri kadar büyümeden kurduğu görülmüştür (Şekil 3.1). Bu nedenle denemenin GF 305 anacı ile olan kısmı kurulamamıştır.



Şekil 3.1. Biyolojik indeksleme amacıyla odunsu indikatör bitkisi olarak kullanılacak GF 305 anacı yetiştirme çalışmaları

### 3.2.1.2. PPV-T'nin *Nicotiana benthamiana*'ya İnokulasyonu ve Virüs Yayılmasının İzlenmesi

Mekanik inokulasyon çalışmaları için 5-6 yapraklı döneme ulaşan *N. benthamiana* fideleri kullanılmıştır. PPV-T ile enfekteli kaynak bitkiden alınan simptomlu yapraklar steril havan kullanılarak buz üstünde fosfat tamponu ile ezilmiş ve 2 katlı tülbent ile süzülükten sonra önceden karborondum tozu serpilerek hazırlanan bitkilerin ilk çıkan üç yaprağına inokule edilmiştir (Şekil 3.2). Deneme 10 tekerrürlü olarak kurulmuştur.

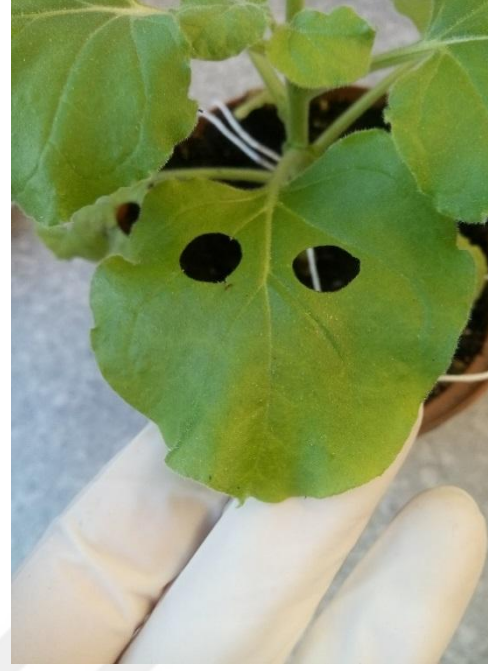


Şekil 3.2. *Nicotiana benthamiana* bitkilerine PPV-T ırkının mekanik inokulasyonu

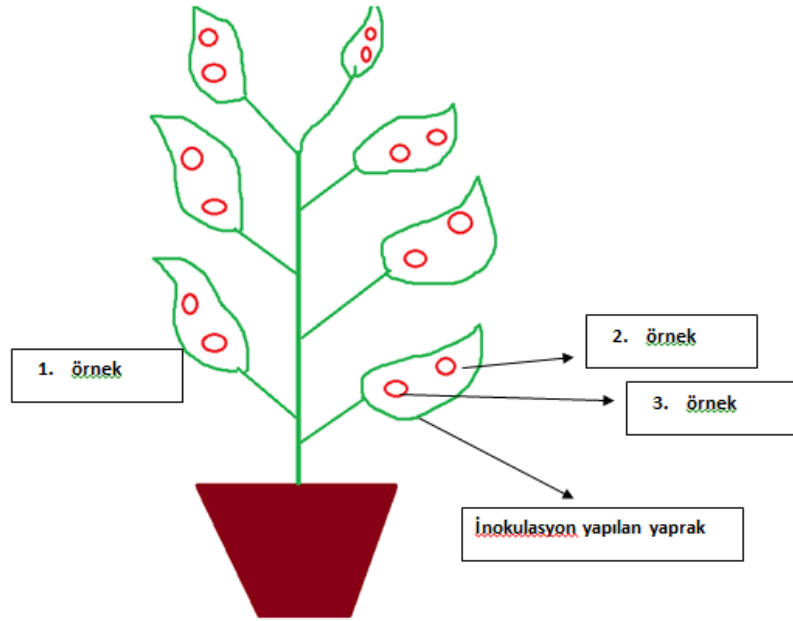
*N. benthamiana* bitkilerinde inokulasyon yapılan yapraktan ikinci günden itibaren her gün 7-8 mm boyutunda disk şeklinde örnekler alınmıştır (Şekil 3.3). 10. güne kadar yapraklardan disk alma işlemine devam edilmiştir. Alınan yaprak diskleriyle hazırlanan ekstraksiyonda virüs miktarı Real Time qPCR ile kantitatif olarak belirlenmiştir.

Bitkilere inokulasyon işlemi 23.12.2018 tarihinde yapılmıştır. İlk örnekler inokulasyondan iki gün sonra inokulasyon yapılan yapraklar ve bu yaprakların hemen üzerindeki yapraktan alınmıştır. Ertesi gün inokulasyon yapılan üçüncü yapraktan (alttan üçüncü yaprak), inokulasyon yapılan yaprağın hemen üzerindeki yapraktan ve onun üzerindeki yapraktan alınarak örnekleme 10 gün devam edilmiştir. Örnekler steril 1000 µl pipet ucunun arkası ile kesilmiş ve steril 1,5µl lik ependorf tüplere aktarılmıştır (Şekil 3.4). Alınan örnek materyal Real-Time qPCR ile testlenmiştir. Real-Time qPCR analizi için standart eğrisi Applied Biosystems firması tarafından düzenlenmiş Plazmitten standart eğrisi hazırlama protokolüne göre hazırlanmıştır.





Şekil 3.3. *Nicotiana benthamiana* bitkilerinden disk şeklinde örnek alma işlemi



Şekil 3.4. *Nicotiana benthamiana* bitkilerinden örnek alma işleminin şematize edilmiş görüntüsü

### 3.2.1.3. Real Time qPCR Reaksiyonu için Standart Hazırlanması

Standart, kantitatif analizlerde kullanılmak amacıyla miktarı ölçülmüş (konsantrasyonu bilinen) nükleik asit örneğidir. Standartlar, sadece kantitasyonu yapılmak istenen hedef gen/patojenin DNA/RNA miktarını yansıtır. Real Time RT-qPCR reaksiyonunda standart olarak kullanılmak üzere PPV-T ile inokule edilmiş olan bitkilerden yaprak örnekleri alınmış ve GENOKS total RNA izolasyon kiti kullanılarak RNA'lar izole edilmiştir. İzole edilen RNA'lardan cDNA elde edilmiş ve görüntülenmiştir. PPV ırkına ait DNA parçalarını çoğaltmak amacıyla PPV universal primerleri olan P1, (5'-3' ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC) ve P2, (5'-3' CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA) kullanılmıştır. Primerler ile çoğaltılmış DNA parçaları pGEM-T Easy plasmid vektörlere klonlanmıştır.

#### 3.2.1.3.1. TOPO® XL PCR Cloning Kit ile Klonlama Aşamaları

1. DNA Cleaning / Extraction Kiti kullanılarak temizleme işlemi
2. TOPO CLONING vektöre klonlama işlemi
3. Transformasyon
4. Kompetent hücrelere plazmidin transforme olup olmadığını belirlemek için PCR işlemi
5. Plasmid izolasyonu ve Klonların Analizi

PCR sonucu çoğaltılan DNA'ların saflaştırılması için MinElute PCR Purification Kit (Quick-Start protokol) kullanılmıştır.

DNA'ların saflaştırılması aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir:

1. 1 µl PCR ürünü için 5 µl PB buffer eklenmiştir. Karışım ependorf tüpü içerisinde hazırlanmıştır.
2. PCR ürünü+PB buffer karışımı spin kolona aktarılmış ve 2 dk santrifüj yapılmıştır.
3. Alta çöken kısım dökülmüş spin kolona 750 µl PE buffer eklenmiştir ve 2 dk santrifüj yapılmıştır.
4. İkinci kez 2 dk santrifüj yapıp alta çöken kısım dökülmüştür. Daha sonra filtre 1,5 µl lik yeni bir ependorf tüpe aktarılmıştır.

5. Üzerine 15 µl distile su (RNase free su) ilave edilmiş ve 1 dk bekletildikten sonra 2 dk santrifüj yapılmıştır.

### 3.2.1.3.2. TOPO® XL Vektore gen Aktarılması

DNA, ekstraksiyon kiti kullanılarak temizlendikten sonra ligasyon reaksiyonunda kullanılmıştır (Çizelge 3.1.).

1. PCR ürünü ve PCR-XL TOPO vektör belirtilen miktarlarda ependorf tube içinde karıştırılmış ve 30 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
2. İnkübasyondan sonra 0,5 µl 6X TOPO cloning stop solution eklenmiş ve oda sıcaklığında birkaç sn karıştırılmıştır.
3. 1 dk santrifüj yapıldıktan sonra hemen buzun üzerine alınmış ve competent hücrelere transformasyona devam edilmiştir.

Çizelge 3.1. Plazmite gen aktarımı için reaksiyon içeriği

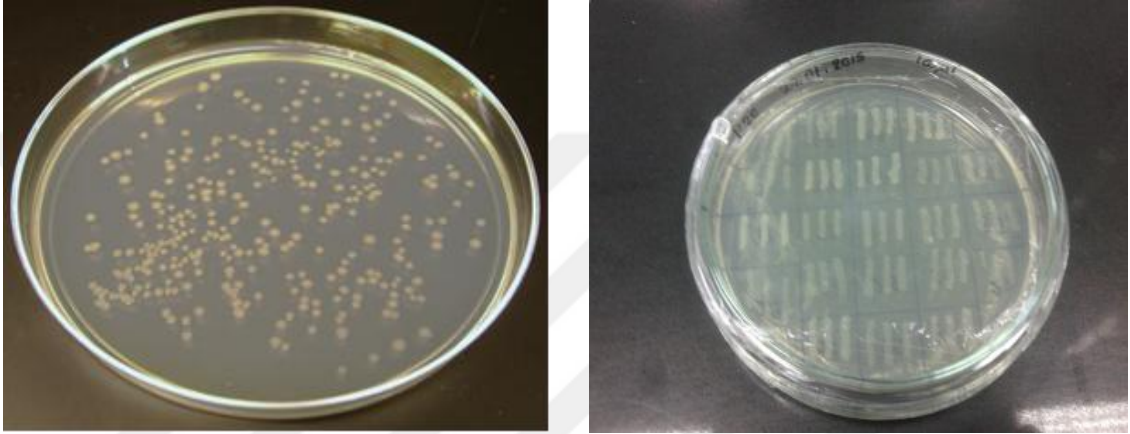
TOPO CLONING REAKSİYONU	1X
PCR ürünü	2 µl
PCR-XL TOPO vektör	0,5 µl
Toplam Hacim	2,5 µl

### 3.2.1.3.3. JM 109 *E. coli* hücrelerine Rekombinant Plazmitlerin Transformasyonu

Kompetan halde bulunan *E. coli* bakterisinden 50 µl alınarak steril ve soğutulmuş

1. 2 µl Topo cloning reaksiyon ürününden One Shot Elektroporation cell üzerine eklenmiş ve yavaşça karıştırılmıştır (pipetleme yapılmamalıdır).
2. Dikkatli bir şekilde hücre ve DNA Elektroporation kuvetine aktarılmıştır.
3. Elektroporasyon işlemi yapılmıştır.
4. İşlem tamamlandıktan sonra hemen üzerine 450 µl SOC ortamından eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır
5. Daha sonra karışım 15 ml lik falkon tüpe aktarılmış ve 37°C’de 1 saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır.

6. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra daha önce hazırlanmış olan 50 µg/ml Kanamisin içeren LB besi yerine baget yardımıyla farklı yoğunlukta (20µl, 50 µl, 100 µl, 150 µl) ekim yapılmıştır.
7. Bir gece boyunca 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır.
8. Gelişen tek kolonilerden alınıp saflaştırma yapılmıştır.
9. Tek koloniler yeni kanamisin içeren ortama aktarılmıştır. Petrinin arkası küçük kare parçalara bölünerek numaralandırılmış ve her bir karenin içerisine steril edilmiş kürdanlarla çizgi şeklinde ekim yapılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra gelişen rekombinant plazmitlerini taşıyan kolonilerin görüntüsü

#### 3.2.1.3.4. Plasmid İzolasyonu ve Klonların Analizi

Rekombinant *E. coli* bakterisinin PPV genini taşıyıp taşımadıklarını kontrol etmek için beyaz koloni içerdikleri plazmit DNA’larını izole etmek için 50 µg/ml Kanamisin içeren LB besi yerine ekim yapılmış ve 37°C de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi günü üreyen bakterilerden plazmitin saflaştırılması amacıyla “Plazmid DNA purification” (GenElute Plasmid Minikrep Kit Sigma PLN-70) kiti kullanılmıştır. Büyüyen rekombinant bakterilerden 2 µl steril ependorf tüplere aktarılmıştır. Oda sıcaklığında 12000×g’de 1 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra pelet üzerine 200 µl resuspension+RNase solüsyonundan eklenmiş ve vortekslendikten sonra üzerine 200 µl Lysis solüsyonundan eklenmiştir. Ters düz edilerek karıştırılmıştır. Karışımın üzerine 350 µl neutralization solüsyonundan eklenmiş ve ters düz edilerek

karıştırılmıştır. Karıştırıldıktan sonra 12000×g de 10 dk santrifüj edilmiştir. Pellet iyice çözdürülmüştür. Karışım colon filtrelere aktarılmadan önce filtreler 500 µl Column Preparation solüsyonuyla hazırlanmıştır ve karışım kolon filtrelere aktarılmış 1 dk 12000×g de santrifüj edilmiştir. Filtrenin altında kalan kısım dökülmüştür ve kontaminasyonların temizlenmesi amacıyla 500 µl Optional Wash Solution eklenmiş 1 dk 12000×g de santrifüj edildikten sonra alt faz dökülmüştür. Kolon filtrenin üzerine ikinci kez 500 µl Wash Solution eklenmiş 1 dk 12000×g de santrifüj edildikten sonra alt faz dökülmüştür. Spin kolon 1 dakika etanolün uzaklaştırılması için kurumaya bırakılmıştır. Spin kolon yeni bir tüpe aktarılmış ve 100 µl Elution solüsyonu ilave edilmiştir. 1 dk 12000×g de santrifüj edildikten sonra filtre atılmıştır. Kompetent hücrelere plazmitin transforme olup olmadığını belirlemek için PCR işlemi yapılmıştır.

Transkript sayısı Applied Biosystems Creating Standard Curves göre hesaplanmıştır. Standarttan seyreltme serileri hazırlanmış ve kullanılıncaya kadar -80°C de muhafaza edilmiştir. Daha sonra bu seyreltme serileri standart eğriyi oluşturmak için kullanılmıştır.

#### **3.2.1.4. Real Time qPCR Analizleri**

Virüsün varlığını belirlemek ve kantitatif değerlere ulaşabilmek amacıyla Real-Time RT-PCR analizleri için Olmos ve ark. (2005) ile Varga ve James (2005) tarafından bildirilen yöntem, çalışmamıza göre optimize edilmiştir. P1, (5'-3' ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC) ve P2, (5'-3' CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA) primerleri kullanılmıştır. Real-time qPCR analizleri, RNA izolasyonu yapmaksızın naylon membranlarda bitki örneklerinin doğrudan ezilmesiyle yapılmıştır. Bitki örneklerinin hazırlanması sonrası yapılan analiz aşaması içermektedir. Real time qPCR analizleri için Roche LightCycler® 480 SYBR Green I Master kiti kullanılmıştır. Kitin içeriği Çizelge 3.1'de belirtildiği gibidir. Buna göre hazırlanan karışımda 10 µl Enzim Karışımı (2X) (Roche), 7.2 µl reaksiyon buffer, P1 primer 0,4 µl, P2 primer 0,4 µl ve 2 µl viral cDNA yer almıştır. Karışımın son hacmi 20 µl olup, PCR koşulları Çizelge 3.2. de belirtildiği şekilde belirlenmiştir.



Çizelge 3.2. Real-time RT-PCR reaksiyon karışımı (Roche LightCycler® 480 SYBR Green I)

Tek reaksiyon (hacim)	Bileşenler
7,2µl	Su, PCR-grade (Roche FastStart ile birlikte sağlanmaktadır)
0,4µl	Forward Primer (F) (ara stok 20 µM)
0,4µl	Reverse Primer (R) (ara stok 20 µM)
10µl	Enzim Karışımı (2X) (Roche)

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan Real Time qPCR sıcaklık döngüleri

Denaturasyon	Amplifikasyon				Melting curve			Cooling
Parametre								
Analiz modu	yok	Kuantifikasyon modu			Erime Eğrisi modu			Yok
Döngü	1	40			1			1
Hedef [°C]	95	95	58	72	95	60	97	40
Süre [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:10	00:00:10	00:00:10	00:00:05	00:00:60	00:00:00	00:00:30
Ramp. Rate [°C/s]	4.40	4.40	2.20	4.40	4.40	2.20	0.2	20
Acquisition Mode	yok	yok	Yok	single	yok	yok	Continuous	Yok

### 3.2.2. Kayseri İlinde PPV-T'nin Doğal Koşullarda Taşınması, Olası Vektörlerin Belirlenmesi ve Anaç Duyarlılık Çalışmaları

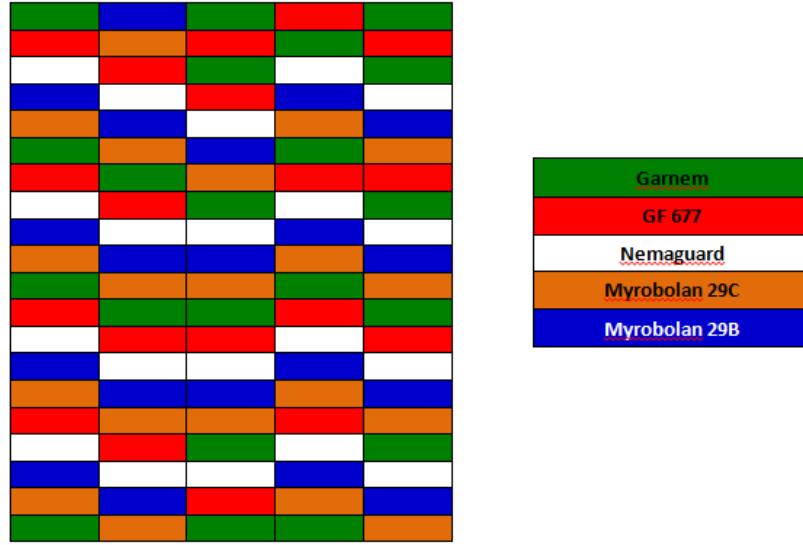
#### 3.2.2.1. PPV-T ile Enfekteli Bahçe Seçimi ve Anaç Parseli Tesisi

Kayseri ilinde PPV ile doğal enfekteli bir kayısı, erik karışık dikim yapılmış bahçe seçilerek bu bahçedeki ağaçlar testlenerek enfeksiyon oranı saptanmıştır. PPV'nin doğal taşınma durumunu ortaya koymak amacıyla seçilen bu bahçenin kenarına PPV'ye duyarlı olduğu bilinen Myrobolan 29 B ve C, NemaGuard, GF677 ve tolerant olarak bilinen Garnem anaçlarından her birinden 200 adet olmak üzere 10 tekerrürlü tesadüf blokları deneme desenine göre dikim yapılmıştır (Şekil 3.6) (Çağlayan ve ark., 2013; Gazel ve ark., 2014).



Şekil 3.6. Anaç deneme parselinin görüntüsü

Deneme Şekil 3.7’de belirtildiği şekilde kurulmuştur. Kullanılan anaçlar PPV’den ari olarak *in-vitro* koşullarda üretilmiş sertifikalı fidanlardır.



Şekil 3.7. Epidemiyolojik çalışmalarda kullanılacak PPV’den ari ve PPV’e duyarlı ve tolerant olarak bilinen farklı anaçlarla kurulmuş parselin deneme deseni

### 3.2.2.2. DAS- ELISA Analizleri

Anaç dikimini izleyen yılın ilkbahar aylarında simptom gösterip göstermemesine bakılmaksızın anaçların tamamından alınan yaprak örnekleri (4 yaprak/anaç) Double Antibody Sandwich-ELISA (DAS-ELISA) yöntemi ile testlenmiştir (Clark ve Adams, 1977).

Standart DAS-ELISA testi aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

1) Immuno gama globülinler (IgG), kaplama tamponu ile 1/100 oranında sulandırılmış ve ELISA plakalarının her bir çukuruna 100 µl konulmuştur. Plakaların üzeri kapatılarak buharlaşma engellemiş ve 37°C'de 4 saat inkübe edilmiştir.

2) İnkübasyondan sonra yıkama tamponu ile tüm çukurlar 3 kez en az 3'er dakika bekletilerek yıkanmıştır. Her yıkamada plakalar hızla ters çevrilerek boşaltılmış ve en son yıkamadan sonra 8-10 katlı peçete üzerine vurularak kuruması sağlanmıştır.

3) Örnek tamponu içinde ezilmiş her bir örnek iki tekrarlı olarak IgG ile kaplanmış plakaya her bir çukura 100 µl olacak şekilde yerleştirilmiştir. Plakaya kontrol olarak ekstraksiyon tampon çözeltisi, antiserum kiti içerisinde gelen pozitif ve negatif kontroller de eklenerek +4°C'de tüm gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

4) Gece boyunca inkübasyondan sonra plakalar 2 numara da belirtildiği şekilde yıkanmıştır.

5) Konjugat tamponu ile konjugatlar 1/1000 oranında sulandırılarak her bir çukura 100 µl konulmuş ve 37°C'de 4 saat inkübe edilmiştir.

6) İnkübasyon sonra plakalar 2 numarada belirtildiği şekilde yıkanmıştır.

7) Substrat tamponu ile taze olarak hazırlanan substrat (1mg/ml p-nitrophenylphosphate) her bir çukura 100 µl konulmuş ve oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. Renk değişimine bağlı olarak 30, 60, 120 dakika sonra plakalar SEAC-SIRIOS marka ELISA mikroplaka optik okuyucusunda 405 nm dalga boyunda okunmuştur. Okunan absorbans değerlerine göre negatif kontrol değerinin en az iki katı ve daha yukarı absorbans değeri veren örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir (Clark ve Adams, 1977).

### 3.2.2.3. Bitkisel Materyalden Total RNA İzolasyonu

DAS-ELISA testlerinde pozitif sonuç veren veya şüpheli görülen sert çekirdekli bitki örneklerinden RT-PCR analizleriyle testlenmek üzere total RNA izolasyonu Geneaid Total RNA izolasyon kiti kullanılarak yapılmıştır.

RNA izolasyonu aşağıdaki şekilde yapılmıştır;

- a) 50-100 mg yaprak örneği sıvı azot ile toz haline gelene kadar ezilmiş ve 1,5 ml lik ependorf tüpüne aktarılmıştır.
- b) 500 µl RB bufer örnek üzerine eklenmiş vorteks ile karıştırıldıktan sonra 60°C'de 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- c) Filtre 2 ml lik tüplere yerleştirildikten sonra örnek karışımı kolona aktarılmış ve 1 dk 1000×g'de santrifüj yapılmıştır.
- d) Alta süzülen sıvı kısım 1,5 ml yeni ependorf tüpe aktarılır, üzerine 1/2 oranında saf ethanol eklendikten sonra nazikce karıştırılmıştır.
- e) Örnek RB filtre üzerine eklenmiş 14.000×g de 1 dk santrifüj yapılmıştır.
- f) Alta çöken sıvı kısım döküldükten sonra RB filtre tekrar aynı tüpe yerleştirilmiştir.
- g) 14.000×g de 30 saniye santrifüj yapılmıştır.
- h) 400 µL W1 bufer RB filtre üzerine eklenmiş ve 14.000×g de 30 saniye santrifüj yapılmıştır.
- i) Alta süzülen sıvı kısım döküldükten sonra filtre 2 ml yeni ependorf tüpe aktarılmıştır.
- j) 600 µL Wash Bufer RB filtrenin üzerine eklenmiş ve 14.000×g'de 30 saniye santrifüj yapılmıştır.
- k) Alta süzülen sıvı kısım döküldükten sonra filtre 2 ml yeni ependorf tüpe aktarılmıştır.
- l) j ve k basamağındaki işlemler ikinci kez tekrarlanmıştır.
- m) RB filtre ependorf tüpe aktarıldıktan sonra 14.000×g'de 3dk filtrenin kuruması için santrifüj yapılmıştır.
- n) Daha sonra filtre 1.5 ml yeni ependorf tüpe aktarılmıştır. Filtre üzerine 30 µL RNase-free su eklenmiş ve 14.000×g'de 1 dk santrifüj yapılarak saf RNA'nın dibe çökmesi sağlanmıştır.

#### **3.2.2.4. cDNA Sentezi ve RT-PCR (Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Analizleri**

Total RNA' lar kalıp olarak kullanılarak cDNA sentezlenmiştir. Random hexamer primerinden 1 µl, RNA'dan 10 µl ve 1 µl 10mM dNTP ile karışım hazırlandıktan sonra 65°C'de 5 dk. inkübe edildikten sonra 5 dk. buz üzerinde bekletilmiştir. Üzerine 1 µl M-MLV ters transkriptaz (Moloney Murine Leukaemia virus reverse transcriptase, 200 unite/µl, Invitrogen), 4 µl 5x Ters Trankriptaz buffer (Invitrogen), 2 µl 0,1M DTT, ve 1 µl RNase free su eklenerek 25°C'de 10 dk., 37°C'de 50 dk., 70°C'de 15 dk. inkübe edildikten sonra buz üzerinde tutulmuştur. Sentezlenen cDNA'lar -20°C'de saklanmıştır. cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak PCR yapılmıştır.

RT-PCR analizleri sırasında PPV için genel olarak kullanılan P1, (5'-3' ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC) ve P2, (5'-3' CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA) primerleri ile çalışılmıştır. Reaksiyonda kullanılacak olan 20 µl karışımın içeriği; 4 µl cDNA ve 10X Taq Buffer 2 µl, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 2 µl, 5 mM dNTP 2 µl, Taq polimeraz 0.5 µl, 25 µM primer P1, 25 µM primer olacak şekilde hazırlanmış ve Thermal Cycler cihazında çoğaltım gerçekleştirilmiştir. RT-PCR analizi için kullanılan amplifikasyon programında öncelikli olarak 95°C de 5 dk, 35 döngü olacak şekilde "95°C'de 30 sn denatürasyon, 52°C'de 45 sn primer bağlanma, 72°C'de 1dk uzama" ve 72 °C'de 7 dk son uzama işlemi gerçekleştirilmiştir (Akbaş ve ark., 2011; Olmos ve ark., 2005; Sertkaya ve ark., 2003). RT-PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezde analiz edilmiştir. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel, ethidium bromide ile boyanarak UV görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir.

#### **3.2.2.5. Afit türlerinin belirlenmesi**

PPV ile enfekteli bahçe içine dikilen in vitro anaçları ziyaret eden ergin kanatlı afit popülasyonu, yapışkan bitki metoduna göre (Avinent ve ark., 1993) izlenmiştir. Bu yöntemde her bir anaç türünde anacın büyüklüğüne göre değişmek üzere haftalık olarak 3 sürgüne yapışkan sprey uygulaması yapılmıştır. Bu sürgünler bir hafta sonra üzerine yapışmış olan afitlerle birlikte toplanmış ve bir sonraki hafta toplanmak üzere yeni sürgünler spreyleneştir (Şekil 3.8).



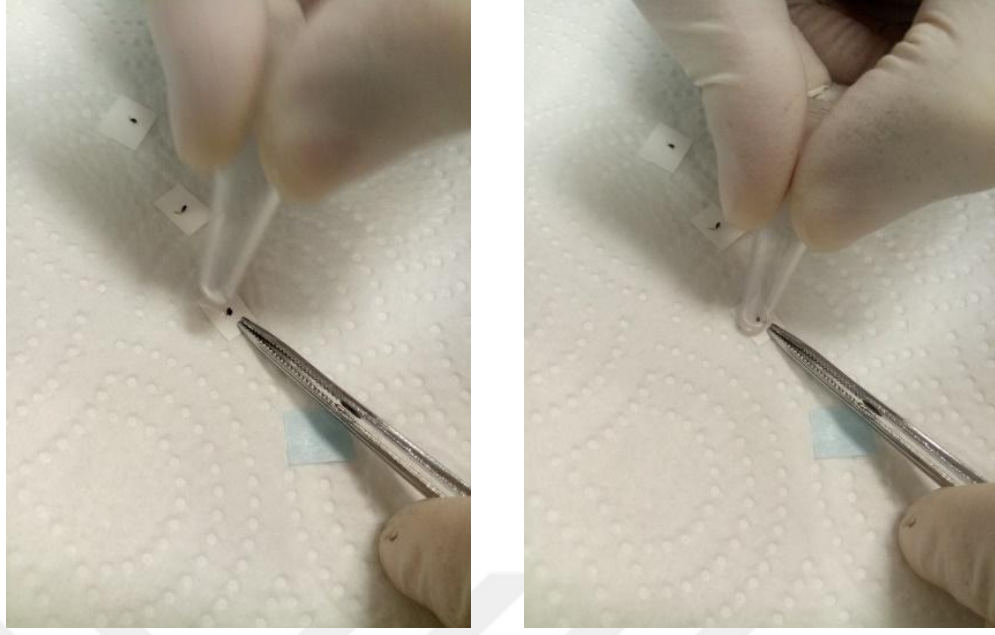
Şekil 3.8. Ergin kanatlı afit popülasyonunun belirlenmesi amacıyla anaç sürgünlerinin yapışkan bitki metoduna göre spreyleneşi

Spreylenen bitkiler laboratuvar ortamına getirilerek üzerine yapışan afitler terpen ile yapıştıkları sürgünlerden ayıklandıktan sonra türlerine göre ayrılmış ve %70'lik alkol içeren tüplere alınmıştır. Toplanan yapışkan sürgünlerdeki ergin afitler seçilerek teşhis edilmiştir. Teşhis işlemleri Dr. Antonio Olmos (IVIA-İspanya) ve Dr. Öğr. Üyesi Kamuran Kaya (Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi) ile birlikte yapılmıştır.

### **3.2.2.6. Afıt Bünyesinde PPV'ün Bulunma Durumunun Real Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction Yöntemi ile Saptanması**

Yoğun olarak bulunan afit türlerinde PPV'ün varlığını belirlemek amacıyla Real time RT-PCR analizleri yapılmıştır (Olmos ve ark., 2005). Bu yöntemde her bir afit tek tek steril selüloz membran (Whatman NC, Roche) üzerine aktarılmıştır (Şekil 3.9) aktarıldıktan sonra 100 µl %0,5'lik Triton X-100 çözeltisi eklenmiş ve 95°C'lik su banyosunda 10 dakika bekletilerek vorteks karıştırıcı ile karıştırılmıştır.





Şekil 3.9. Yaprak bitlerinin ependorf tüpün tabanıyla membran (3 MM Whatman) üzerine ezilerek (solda) pens yardımı ile ependorf tüp içerisine alınması

Ezilen afit örnekleri Çizelge 3.4'deki primer dizileri kullanılarak Real Time- RT-PCR analize tabi tutulmuştur. RT-PCR için reaksiyon karışımında 1X için H<sub>2</sub>O (1,89 µl), 2x RT-PCR (6 µl), 25 x Enzyme Mix (0,5 µl), probe primerler ise P241(100uM) 0,12 µl, P316D(100 uM) 0.6µl, 5uM STQ 0,37 µl ve kalıptan 3 µl olmak üzere toplam 12 µl hazırlanmıştır. Real-Time RT-PCR reaksiyonları 1 döngü 45°C 10 dk ve 95°C de 10 dk ve 45 döngü için 95°C 15 sn ve 60°C de 45 sn şeklindedir (Olmos ve ark., 2005; Osman ve Rowhani, 2006).

Çizelge 3.4. Plum pox virus'un tespitinde kullanılan Real Time RT-PCR primer dizileri

Primer adı	Primer baz dizisi	5' modifikasyon	3' modifikasyon
P241 primer	5'- CGTTTATTTGGTTGGATGGAA-3'	Yok	Yok
P316D primer	5'- GATTAACACACCAGCGGTGTG-3'	Yok	Yok
P316M primer	5'- GATTCACGTCACAGCGGTGTG-3'	Yok	Yok
Taq Man probu	5-CGT CGGAAC ACA AGA AGA GGA	Fam	Tamra
PPV-DM	CAC AGA-3		

#### **4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA**

Bu çalışma 2015-2017 yılları arasında yürütülmüş olup “Plum pox virus (PPV) ile İnokule Edilen Test Bitkilerinde Virüs Hareketinin Kantitatif Olarak Belirlenmesi” ve “Kayseri İlinde PPV-T İrkının Epidemiyolojisinin Araştırılması” olmak üzere iki ana başlık altında yapılan çalışmaları içermektedir.

##### **4.1. Real-Time qPCR Optimizasyonu ve *Nicotiana benthamiana* Bitkisinde Plum pox virus (PPV)’ün Hareketinin İncelenmesi**

PPV-T’nin otsu konukçusu *N. benthamiana* içindeki hareketi ve yayılma hızını izlemek amacıyla PPV-T ile enfekteli tütün bitkisinden, 7 adet sağlıklı tütün bitkisine mekanik inokulasyon yapılmıştır. İnokülasyon işlemini takip eden 9. günde ilk virüs belirtileri en üstteki genç yapraklarda gözlenmiştir. 10 günlük semptomatolojik gözlemler sonucunda 5 adet tütün bitkisinin yapraklarında geniş mozaik lekeler, damar aralarında renk değişimleri, deformasyonlar ve yaprak üzerinde kabarıklıklar şeklinde virüs belirtileri gözlenmiştir (Şekil 4. 1).





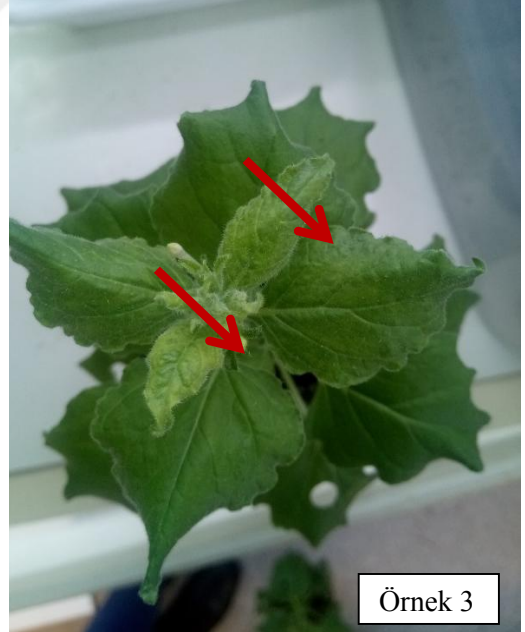
Örnek 1



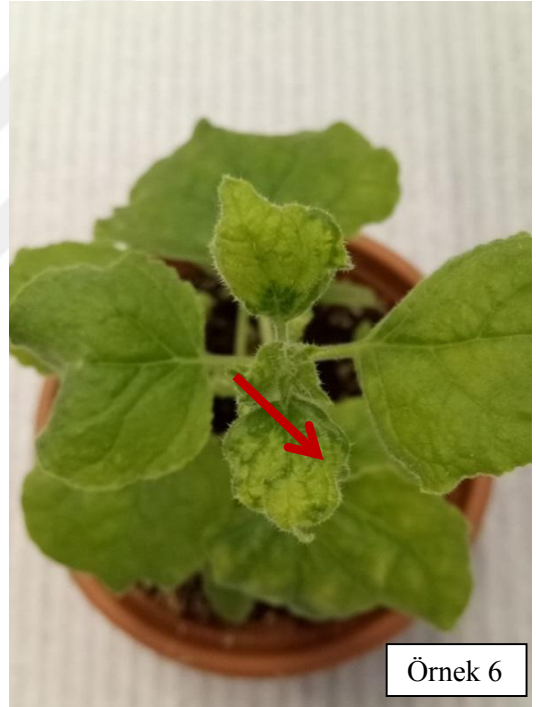
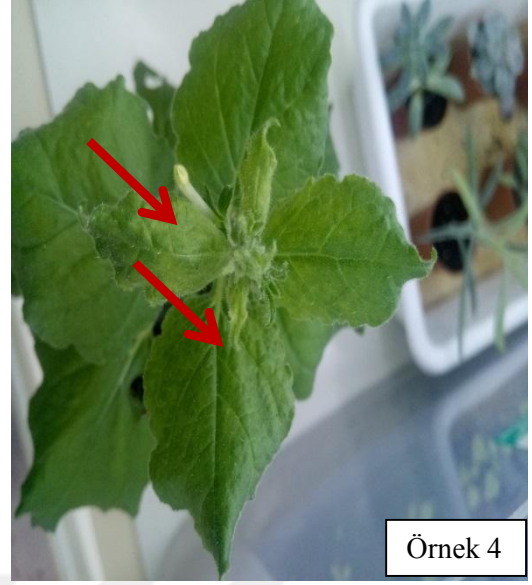
Örnek 1



Örnek 3



Örnek 3



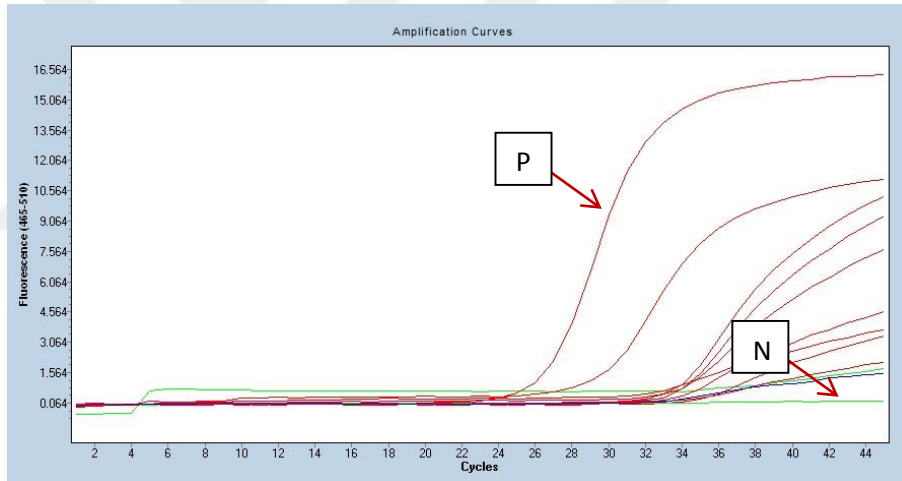




Şekil 4.1. Mekanik inokulasyon yöntemiyle PPV-T ile enfekte edilen *Nicotiana benthamiana* bitkisinin yaprak damarlarında gözlenen bantlaşma, damar aralarında renk açılmaları ve kabartılar ve bu bitkide virüsün hareketliliğinin izlenmesi amacıyla disklerin alınması

PPV-T ile inokule edilen tütün bitkilerinde Türkiye'ye özgü bir ırk olan PPV-T'nin hareketi kantitatif Real Time PCR yöntemi kullanılarak incelenmiş ve virüsün test bitkilerinde kaç günde ne kadar ilerlediği ve hangi yoğunluğa eriştiği belirlenmiştir. İnokule edilen tütün bitkilerinde yapılan simptomolojik gözlemler sonucunda ilk belirtiler, inokulasyondan sonra 9. günde bitkinin üstteki en genç yapraklarında hafif açık yeşil koyu yeşil renklenmeler şeklinde ortaya çıkmıştır. Bu durum virüsün yoğunluğunun bitkide 9. günden itibaren artmış olabileceğini göstermektedir. İnokulasyon yapıldıktan iki gün sonra alınan yaprak örneklerinde PPV-T'nin 2 ila 4 gün içerisinde alttan 3-5. yapağa ulaştığı tespit edilmiştir. Virüs, 4 numaralı tütün örneğinde inokulasyondan sonra 2. günde 3 nolu yaprakta  $2.16E1$  konsantrasyonda saptanırken 1 numaralı tütün örneğinde inokulasyondan 6 gün sonra 5 nolu yaprakta  $5.47E1$  konsantrasyonda saptanmıştır (Çizelge 4.1; Şekil 4.2). Konuyla ilgili dünyada ve Türkiye'de yapılan çalışmalarla ilgili makaleler incelendiğinde bu çalışma ile benzerlik

gösteren herhangi bir yayına ulaşamamıştır. PPV'nin bitkide hareketi ile ilgili çalışmaların birçoğu etmenin floemle mi ya da ksilemle mi taşındığını belirlemek amacıyla yapılmıştır. PPV'nin bitki içinde uzun mesafelere taşınmasıyla ilgili yürütülen bu çalışmalar genellikle serolojik ve RT-PCR yöntemleri kullanılarak yapılmıştır (Dicenta ve ark., 2003; Rubio ve ark., 2008). Olmos ve ark. (2005)'nin PPV ile enfekteli *N. benthamiana* bitkisinden izole ettikleri RNA'ların 1/10- 1:65,536,000 aralığında seyrelterek kullanarak yaptıkları TaqMan real-time RT-PCR analizi sonucunda son seyreltme oranında virüs konsantrasyon ölçümü yapılamamıştır. Bu çalışmada da inokule edilen tütün bitkilerinden sadece 1 ve 4 nolu bitkide virüs replikasyonunun ve bitkide ilerleme hızının belirlenebilmesi nedeniyle her inokule edilen bitkide virüs replikasyonunun aynı şekilde ilerlemediği görüşüne varılmıştır. Bununla birlikte bu çalışmada elde edilen ön bulguların daha detaylı çalışmalarla desteklenmesi ve araştırılması gereklidir.



Şekil 4.2. Real-time qPCR ile PPV-T tespit edilen *N. benthamiana* örneklerinin bir DNA amplifikasyon eğrisi (P: Pozitif kontrol, N: Negatif kontrol).

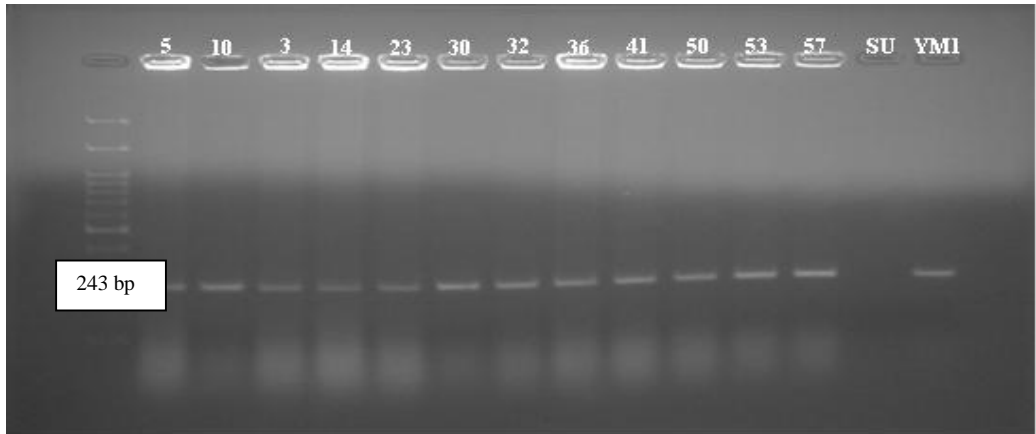
Çizelge 4.1. *N. benthamiana* bitkilerinde PPV-T ırkının ikinci ve dördüncü günde pozitif olarak belirlenen yaprak örneklerinin Real Time qPCR analiz sonuçları (CP: Crossing point (DNA çoğalmasının görünebilir olduğu ilk nokta))

Örnek adı	Cp	Konsantrasyon
Pozitif kontrol	25,87	1.88E6
Standart 10 <sup>5</sup>	28.24	2.16E5
Standart 10 <sup>4</sup>	31.43	1.18E4
Standart 10 <sup>3</sup>	36.67	9.97E3
Standart 10 <sup>2</sup>	35.55	2.78E2

Standart 10 <sup>1</sup>	38.82	1.41E1
4. bitki inokulasyon yapılan 3. Yaprak	28.48	2.16E1
1. bitki inokulasyon yapılan yaprakların 2. üst yaprak örneği	31.48	5.47E1
Negatif kontrol	-	-

#### 4.2. Topo XL Klonlama Vektöründe Tüm Genomun Varlığının PCR Analizleri ile Doğrulanması

Plazmitlerin PPV içerip içermediğini doğrulamak için universal primerler ve plazmitlerin kalıp DNA olarak kullanılmasıyla PCR yapılmıştır. PCR ürünleri %1,5' luk agaroz jel üzerine yüklenmiş daha sonra 120 V'da 120 dk elektroforez cihazında koşturulmuştur. PCR ürünlerinin görüntülenmesi Bio-Rad görüntüleme cihazında ultraviyole ışık altında gerçekleştirilmiştir. Yapılan PCR işleminden elde edilen ürünler jelde görüntülenmiştir. Jelde bant veren koloniler plazmitin bakteri hücrelerine transforme olduğunu göstermiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. PCR ürünlerinin %1,5 lik agaroz jelde görüntülenmesi sonucu elde edilmiş jel görüntüsü (Çukurların üzerinde belirtilen rakamlar saflaştırılmış *E. coli* bakterilerinin çizgi şeklindeki tek kolonilerden alınmış örneklerdir. Su: Negatif kontrol olarak, YM1: Pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.).

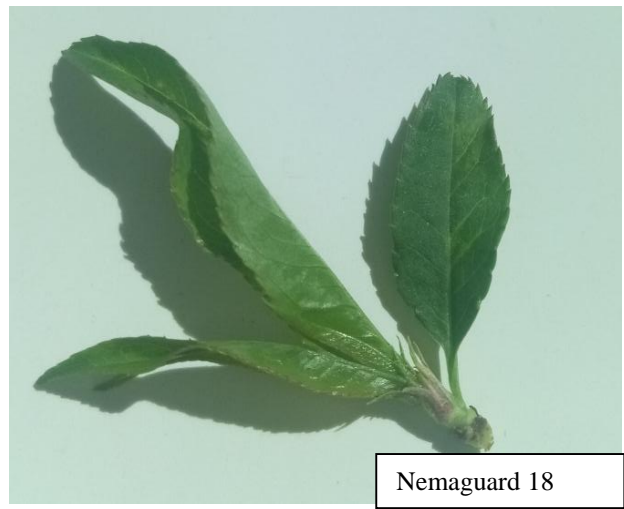
### 4.3. Kayseri İli Koşullarında Bazı *Prunus* Anaçlarının Plum pox virus'üne (PPV) Duyarlılığının Belirlenmesi

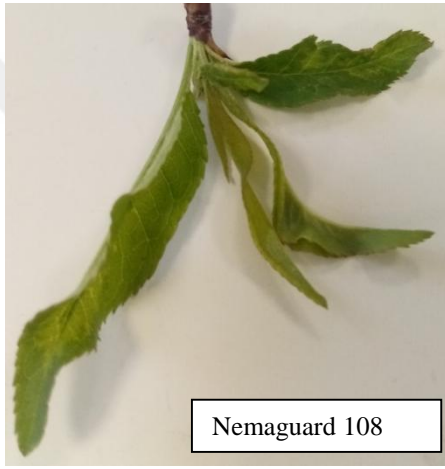
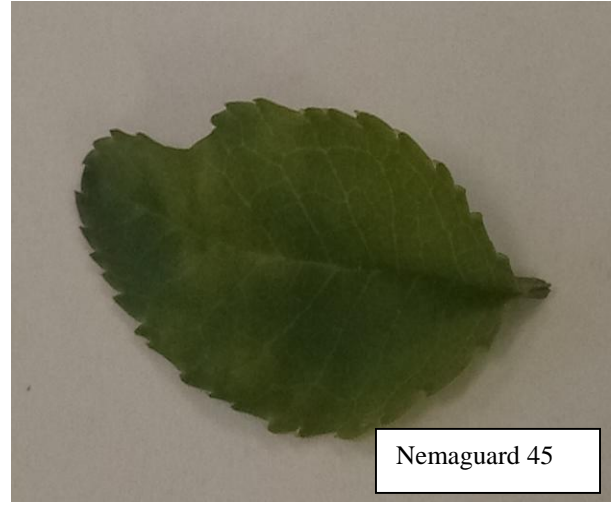
#### 4.3.1. Simptomolojik gözlemler

##### 4.3.1.1. Deneme parselinde Plum pox virus semptomu gösteren anaçlar

Plum pox virus (PPV) belirtilerinin saptanması için anaçlardan ilkbahar ve sonbahar döneminde simptomolojik gözlemler yapılmıştır. Duyarlı çeşitlerde yaprak belirtileri ilkbahar aylarında belirgin iken havaların ısınması ile birlikte yaz ve sonbahar aylarında kaybolmaktadır (Agrios, 2005; Anonim, 2008; Sochor ve ark., 2012). Anaç türlerinin çoğunda semptom görülmezken sadece Nemaguard ve Myrobalan anaçlarında yapraklarda bantlaşma ve klorotik halkalı lekeler gözlemlenmiştir (Şekil 4.4).

Son yıllarda yürütülen PPV'ye anaçların duyarlılığı ile ilgili çalışmalarda PPV'nin afitlerle doğal enfeksiyonuna en hassas anaçların Nemaguard, Mariana GF 8.1, Myrobalan 29C ve Adesoto olduğu, Greenpack ve Garnem'in orta derecede duyarlı olduğu ve GF677 ile Cadaman anaçlarının ise oldukça tolerant olduğunu bildirmişlerdir (Vidal ve ark., 2010; Milusheva ve Bozhkova, 2013). Doğal inokulum koşullarında PPV-T ırkının farklı anaçlara karşı duyarlılığının araştırıldığı bir çalışmada ise Myrobalan 29C ve Nemaguard PPV-T enfeksiyonuna en hassas anaçlar olarak bulunmuştur (Çağlayan ve ark., 2014). Çalışmamızın sonucunda elde edilen sonuçlar yapılan birçok çalışmayla paralellik göstermiştir.





Şekil 4.4. Anaç deneme parcelinden toplanan Şarka semptomu gösteren anaç yaprak örnekleri



#### 4.3.1.2. Plum pox virus-Turkey (PPV-T) ile Enfekteli Olan Deneme Parselinin Çevresinde Bulunan *Prunus spp.* Bahçesinde Simptomolojik Gözlemler

Enfeksiyon kaynağı olan bahçedeki *Prunus* (Şekil 4.5.) türlerinde simptomolojik gözlemler sonucunda plum pox virus (PPV) belirtileri gözlemlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.5. Anaç deneme parselinin bulunduğu enfeksiyon kaynağı olan bahçedeki *Prunus* ağaçlarında alınan örneklerin koordinatları (B13 kodu anaç deneme parselinin simgelemektedir, B14 (erik), B15 (şeftali), B16 (erik), B12 (kayısı), B4 (erik) ve B7 (kayısı)).





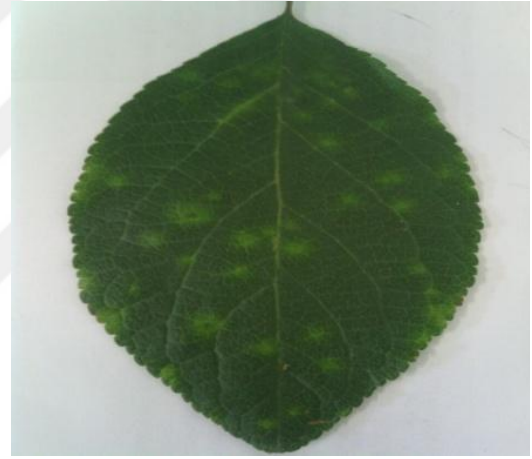
B4 Erik



B7 Kayısı



B12 Kayısı



B14 Erik



B15 Şeftali

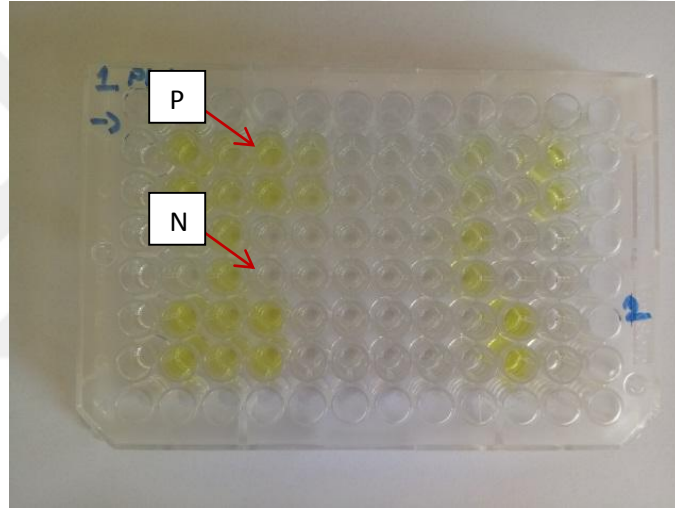


B16 Erik

Şekil 4.6. Anaç deneme parselinin bulunduğu enfeksiyon kaynağı olan bahçedeki Prunus ağaçlarında Şarka simptomsu görüntüleri (B4 (erik), B7 (kayısı), B12 (kayısı), B14 (erik), B15 (şeftali) ve B16 (erik)).

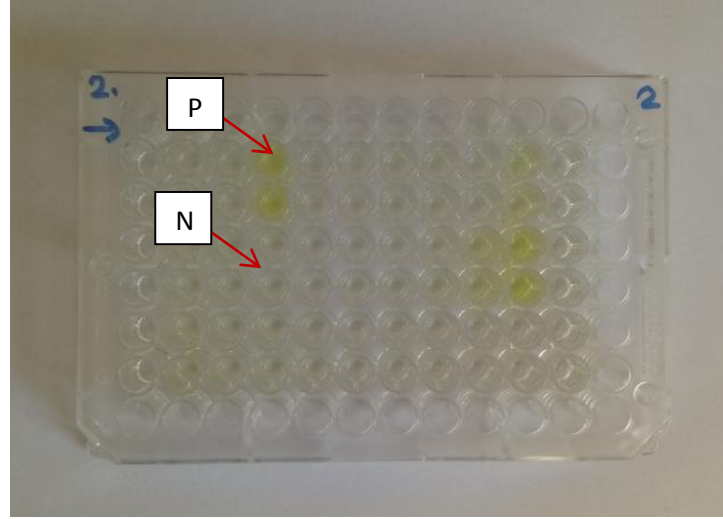
#### 4.3.2. Deneysel Anaç Parselinde Bulunan Anaçların ve Etrafındaki Prunusların DAS ELISA ve RT-PCR Analiz Sonuçları

Deneysel anaç parselinde bulunan tüm anaçlardan alınan örnekler gerek ilkbahar ve gerekse sonbahar döneminde Double Antibody Sandwich-ELISA (DAS-ELISA) yöntemi ile testlenmiştir (Clark ve Adams, 1977). İlkbahar ve sonbahar aylarında deneme parselinden 2015 yılında toplanan 641, 2016 yılında 610 ve 2017 yılında 601 adet örnek DAS-ELISA yöntemiyle testlenmiştir. Testlenen örneklerden sadece Nemaguard ve Myrobalan anaçlarından alınan örneklerde pozitif sonuç alınmıştır. (Şekil 4.7; 4.8). Bu durum simptomolojik gözlemleri de doğrular niteliktedir.



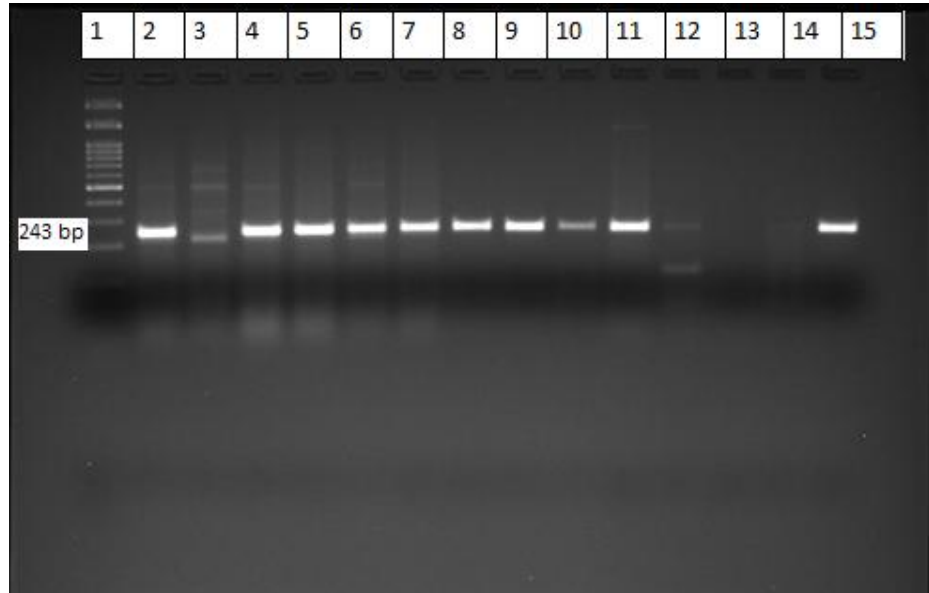
Şekil 4.7. Deneysel anaç parselinde bulunan *Prunus spp.* anaçlarının DAS – ELISA ile testlenmesi sonucu pozitif bulunan Nemaguard ve Myrobalan anaçlarına ait bitki örneklerinin görsel değerlendirilmesi (P:Pozitif kontrol, N: Negatif kontrol)

Anaç deneme parselinin etrafında bulunan *Prunus* çeşitlerinden örnekler alınmış DAS-ELISA yöntemi ile testlenmiştir. Bu analizlerin sonucuna göre deneme alanı etrafındaki ağaçlardan B14 (Erik), B15 (Şeftali), B16 (Erik), B12 (Kayısı), B4 (Erik) ve B7 (Kayısı) pozitif sonuç vermiştir.



Şekil 4.8. Deneysel anaç parselinde bulunan *Prunus spp.* anaçlarının DAS-ELISA ile testlenmesi sonucu pozitif bulunan Nemaguard ve Myrobolan anaçlarına ait farklı bitki örneklerinin görsel değerlendirilmesi (P:Pozitif kontrol, N: Negatif kontrol)

DAS-ELISA ile pozitif bulunan anaç örnekleri ve pozitif örneklerin çevresinde bulunan ancak ELISA ile negatif sonuç veren örnekler RT-PCR analizleri ile testlendiğinde sadece DAS-ELISA ile pozitif bulunan örnekler RT-PCR ile de pozitif bulunmuştur (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. PPV'ye spesifik P1/P2 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen RT-PCR analizi sonucuna göre DAS ELISA testinde pozitif çıkan anaçların hepsi pozitif reaksiyon göstermiştir. (1: Markör, 2: N108, 3: N 65, 4: N 148, 5: N 18, 6: N44, 7: N45,

8: C58 9: C44, 10: KNT +, 11: B 72, 12: C65, 13: B15, 14: Negatif kontrol, 15: Pozitif Kontrol) (N: Nemaeguard, C: Myrobalan 29C, B: Myrobolan 29B)

Son yıllarda PPV'ye karşı anaç duyarlılığı ile ilgili çalışmalarda afitlerle doğal enfeksiyona en hassas anaçların Nemaeguard, Mariana GF 8.1, Myrobalan 29C, Myrobolan 29B ve Adesoto olduğu, Greenpack ve Garnem'in orta derecede duyarlı olduğu ve GF677 ile Cadaman anaçlarının ise oldukça tolerant olduğunu bildirmişlerdir (Vidal ve ark., 2010; Milusheva ve Bozhkova, 2013; Çağlayan ve ark., 2013; Kaya ve ark., 2014).

Bizim çalışmamızda kullanılan Garnem, GF 677, Myrobolan 29C ve 29B, Nemaeguard anaçları içerisinde daha önceki çalışmalarda da PPV'ye duyarlı olduğu belirtilmiş olan Myrobolan 29C, 29B ve Nemaeguard anaçları 3 yıl süresince PPV'ye en duyarlı anaçlar olarak saptanmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Deneysel anaç parselinde bulunan farklı anaçların PPV açısından DAS-ELISA ve RT-PCR ile testlenmesi sonucu elde edilen sonuçlar

<b>Kullanılan Anaçlar</b>	<b>Pozitif anaç sayısı/Toplam anaç sayısı (2015)</b>	<b>Pozitif anaç sayısı/Toplam anaç sayısı (2016)</b>	<b>Pozitif anaç sayısı /Toplam anaç sayısı (2017)</b>
Garnem	0/134	0/134	0/125
GF 677	0/144	0/141	0/138
Myrobolan 29C	0/74	2/73	2/72
Myrobolan 29B	0/97	1/96	1/96
Nemaeguard	0/192	6/166	6/170
<b>Toplam</b>	<b>0/641</b>	<b>9/610</b>	<b>9/601</b>

Deneme parselinde 2016-2017 yıllarında alınan örneklerden DAS-ELISA ve RT-PCR analizleri sonucunda pozitif çıkan örneklerin sekans analizleri sonucu elde edilen baz dizileri NCBI 'da BLAST programı ile ırk düzeyinde belirlenmiştir. Elde edilen sekans sonuçlarının GenBank'a kayıtlı sekans sonuçları ile karşılaştırılmaları sonucunda pozitif anaç örneklerinin hepsinin PPV-T ırkı ile yüksek oranda benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.10).

## Plum pox virus isolate AnYnAp129, complete genome

Sequence ID: [MF346257.1](#) Length: 9784 Number of Matches: 1

Range 1: 2924 to 3736 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1469 bits(795)	0.0	807/813(99%)	0/813(0%)	Plus/Plus
Query 1	GGAGTTGGAGCAGGCTTGGAGAGAATTAAGTTGGTCGGAAAAGATTCTCTGCAATCTTGGAA	60		
Sbjct 2924	GGAGTTGGAGCAGGCTTGGAGAGAATTAAGTTGGTCGGAAAAGATTCTCTGCAATCTTGGAA	2983		
Query 61	ATCGCAGCGGTGGCGAAAAACATATACCAAAGCCCTTTCATCCCGAAAAGACGCGAGCAGATT	120		
Sbjct 2984	ATCGCAGCGGTGGCGAAAAACATATACCAAAGCCCTTTCATCCCGAAAAGACGCGAGCAGATT	3043		
Query 121	AGGAGGCAGGTACGACATCTCCGTTCCGGTCACTTGGCAGTCAATACAAAACGCCTGAA	180		
Sbjct 3044	AGGAGGCAGGTACGACATCTCCGTTCCGGTCACTTGGCAGTCAATACAAAACGCCTGAA	3103		
Query 181	AGACGTGGTTCGGCGGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTACACACACCAGTCGATGGGGAA	240		
Sbjct 3104	AGACGTGGTTCGGCGGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTACACACACCAGTCGATGGGGAA	3163		
Query 241	GCTATTCTGCAAAAGCTATCGGAAATTTCCACAAGTTTTCTTCCAAGCACTCTGAAAGATGTT	300		
Sbjct 3164	GCTATTCTGCAAAAGCTATCGGAAATTTCCACAAGTTTTCTTCCAAGCACTCTGAAAGATGTT	3223		
Query 301	TGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTGGCTTTCAATAGGAGCCACATGTAATTCAATGAT	360		
Sbjct 3224	TGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTGGCTTTCAATAGGAGCCACATGTAATTCAATGAT	3283		
Query 361	TAATGAACATAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGTGAAAGATAAGAAAAGATTCAA	420		
Sbjct 3284	TAATGAACATAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGTGAAAGATAAGAAAAGATTCAA	3343		
Query 421	GAGATTGCAGGTTTTGACACGAGACTATCAGAAAAGGTTGGTTGCACACCAACAGCGGA	480		
Sbjct 3344	GAGATTGCAGGTTTTGACACGAGACTATCAGAAAAGGTTGGTTGCACACCAACAGCGGA	3403		
Query 481	TGAATTTCTTGAATATGTGCAAGGTGAAAACCCGATCTATTGAAACATGCAGAGGACTT	540		
Sbjct 3404	TGAATTTCTTGAATATGTGCAAGGTGAAAACCCGATCTATTGAAACATGCAGAGGACTT	3463		
Query 541	GATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAGTAAAAGAGATTCAAAAGCTAATCTGGA	600		
Sbjct 3464	GATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAGTAAAAGAGATTCAAAAGCTAATCTGGA	3523		
Query 601	ACGAGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTATGATGCTTTTTGACTCGGAGCGGAGTGATGG	660		
Sbjct 3524	ACGAGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTATGATGCTTTTTGACTCGGAGCGGAGTGATGG	3583		
Query 661	TGTTTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGTGTGATGGGAAGTATCGATCAGACTGTTCA	720		
Sbjct 3584	TGTTTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGTGTGATGGGAAGTATCGATCAGACTGTTCA	3643		
Query 721	CCATCAAAGTTTGGACGACATTGAAGACATATTGGACGAAAAGAAAGTTGACAGTCGATT	780		
Sbjct 3644	CCATCAAAGTTTGGACGACATTGAAGACATATTGGACGAAAAGAAAGTTGACAGTCGATT	3703		
Query 781	TGTCTTGCAAAGTAATGAAGTTGCACCAACTGT	813		
Sbjct 3704	TGTCTTGCAAAGTAATGAAGTTGCACCAACTGT	3736		

Nemaguard 108 kodlu pozitif anaç örneğinin NCBI 'da yapılan BLAST sonuçlarına bakıldığında PPV izolatının % 99 oranında –T ırkı ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir



### Plum pox virus isolate AnYnAp129, complete genome

Sequence ID: [MF346257.1](#) Length: 9784 Number of Matches: 1

Range 1: 2923 to 3736 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1459 bits(790)	0.0	805/814(99%)	0/814(0%)	Plus/Plus
Query 1	AGGAGTKGGAGCAGGCTTGGAGAGAATTAAGTTGGTCGGAAAAGATTCTCTGCAATCTTGG			60
Sbjct 2923	AGGAGTTGGAGCAGGCTTGGAGAGAATTAAGTTGGTCGGAAAAGATTCTCTGCAATCTTGG			2982
Query 61	AATCGCAGCGGTGGCGAAAACATA TACCAAAGCCTTTCATCCC GAAAAGACGCA GAGATT			120
Sbjct 2983	AATCGCAGCGGTGGCGAAAACATA TACCAAAGCCTTTCATCCC GAAAAGACGCA GAGATT			3042
Query 121	TAGGAGGCAAGTACGACATCTCCGTTTCGGTCACTTACTTGGCAGTCAATACAAAACGCTTGA			180
Sbjct 3043	TAGGAGGCAAGTACGACATCTCCGTTTCGGTCACTTACTTGGCAGTCAATACAAAACGCTTGA			3102
Query 181	AAGACGTGGTTTCGGCGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTACACACACCAAGTCGATGGGGA			240
Sbjct 3103	AAGACGTGGTTTCGGCGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTACACACACCAAGTCGATGGGGA			3162
Query 241	AGCTATTCTGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAAGTTTCTTCCAAGCACTCTGAAGATGT			300
Sbjct 3163	AGCTATTCTGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAAGTTTCTTCCAAGCACTCTGAAGATGT			3222
Query 301	TTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTGTCTTCAATAGGAGCCACATGTAATTCAATGA			360
Sbjct 3223	TTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTGTCTTCAATAGGAGCCACATGTAATTCAATGA			3282
Query 361	TCAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGTGAAGATAAGAAAAGATTCA			420
Sbjct 3283	TCAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGTGAAGATAAGAAAAGATTCA			3342
Query 421	AGAGATTGCAGGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAGGTTGGTTGCACACCAACAGCGG			480
Sbjct 3343	AGAGATTGCAGGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAGGTTGGTTGCACACCAACAGCGG			3402
Query 481	ATGAATTTCTTGAATATGTGCAAGGTGAAAACCTGATCTATTGAAACATGCAGAGGACT			540
Sbjct 3403	ATGAATTTCTTGAATATGTGCAAGGTGAAAACCTGATCTATTGAAACATGCAGAGGACT			3462
Query 541	TGATTGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAGTAAAAGAGATTCAAGCTAATCTGG			600
Sbjct 3463	TGATTGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAGTAAAAGAGATTCAAGCTAATCTGG			3522
Query 601	AACGAGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTATGATGCTTTTTGACTCGGAGCGGAGTGATG			660
Sbjct 3523	AACGAGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTATGATGCTTTTTGACTCGGAGCGGAGTGATG			3582
Query 661	GTGTTTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAAGGCGTCATGGGAAAGTATCGATCAGACTGTTT			720
Sbjct 3583	GTGTTTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAAGGCGTCATGGGAAAGTATCGATCAGACTGTTT			3642
Query 721	ACCACCAAAGTTTGGACGACATTGAAGACATGTTGGATGAAAAGAAAGTTGACAGTCGATT			780
Sbjct 3643	ACCACCAAAGTTTGGACGACATTGAAGACATGTTGGATGAAAAGAAAGTTGACAGTCGATT			3702
Query 781	TTGTCTTGCAAAGTAATGAASTTGCAACCAACTGT		814	
Sbjct 3703	TTGTCTTGCAAAGTAATGAASTTGCAACCAACTGT		3736	

Nemaguard 18 kodlu pozitif anaç örneğinin NCBI 'da yapılan BLAST sonuçlarına bakıldığında PPV izolatının % 99 oranında -T ırkı ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir

**Plum pox virus isolate AnYnAp129, complete genome**

Sequence ID: [MF346257.1](#) Length: 9784 Number of Matches: 1

Range 1: 2924 to 3736 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1474 bits(798)	0.0	808/813(99%)	0/813(0%)	Plus/Plus
Query 1	GGAGTTGGAGCAGGCTTGGAGAGAATTAAGTTGGTCGGAAAGATTCTCTGCAATCTTGG	60		
Sbjct 2924	GGAGTTGGAGCAGGCTTGGAGAGAATTAAGTTGGTCGGAAAGATTCTCTGCAATCTTGG	2983		
Query 61	ATCGCAGCGGTGGCGAAAAACATATACCAAAGCCCTTTCATCCCAGAAAGACGCAGCAGATTT	120		
Sbjct 2984	ATCGCAGCGGTGGCGAAAAACATATACCAAAGCCCTTTCATCCCAGAAAGACGCAGCAGATTT	3043		
Query 121	AGGAGGCAGGTACGACATCTCCGTTTCGGTCACTTACTTGGCAGTCAATACAAACGCCTGAA	180		
Sbjct 3044	AGGAGGCAGGTACGACATCTCCGTTTCGGTCACTTACTTGGCAGTCAATACAAACGCCTGAA	3103		
Query 181	AGACGTGGTTCGGCGGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTACACACACCAGTCGATGGGGAA	240		
Sbjct 3104	AGACGTGGTTCGGCGGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTACACACACCAGTCGATGGGGAA	3163		
Query 241	GCTATTCTGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCTTCCAAGCACTCTGAAGATGTT	300		
Sbjct 3164	GCTATTCTGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCTTCCAAGCACTCTGAAGATGTT	3223		
Query 301	TGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTGCTTTCAATAGGAGCCACATGTAATTCATGAT	360		
Sbjct 3224	TGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTGCTTTCAATAGGAGCCACATGTAATTCATGAT	3283		
Query 361	TAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGTGAAGATAAGAAAAGATTCAA	420		
Sbjct 3284	TAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGTGAAGATAAGAAAAGATTCAA	3343		
Query 421	GAGATTGCAGGTTTTGCACACGAGACTATCAGAAAAGGTTGGTTGCACACCAACAGCGGA	480		
Sbjct 3344	GAGATTGCAGGTTTTGCACACGAGACTATCAGAAAAGGTTGGTTGCACACCAACAGCGGA	3403		
Query 481	TGAATTTCTTGAATATGTGCAAGGTGAAAACCCCTGATCTATTGAAACATGCAGAGGACTT	540		
Sbjct 3404	TGAATTTCTTGAATATGTGCAAGGTGAAAACCCCTGATCTATTGAAACATGCAGAGGACTT	3463		
Query 541	GATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAGTAAAAGAGATTACAAAGCTAATCTGGA	600		
Sbjct 3464	GATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAGTAAAAGAGATTACAAAGCTAATCTGGA	3523		
Query 601	ACGAGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTATGATGCTTTTTGACTCGGAGCGGAGTGATGG	660		
Sbjct 3524	ACGAGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTATGATGCTTTTTGACTCGGAGCGGAGTGATGG	3583		
Query 661	TGTTTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGTGTGATGGGAAGTATCGATCAGACTGTTCA	720		
Sbjct 3584	TGTTTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGTGTGATGGGAAGTATCGATCAGACTGTTCA	3643		
Query 721	CCATCAAAGTTTGGACGATATTGAAGACATGTTGGACGAAAAGAAAGTTGACAGTCGATTT	780		
Sbjct 3644	CCATCAAAGTTTGGACGACATTGAAGACATGTTGGACGAAAAGAAAGTTGACAGTCGATTT	3703		
Query 781	TGCTTTGCAAAGTAATGAAGTTGCACCAACTGT	813		
Sbjct 3704	TGCTTTGCAAAGTAATGAAGTTGCACCAACTGT	3736		

Nemaguard 45 kodlu pozitif anaç örneğinin NCBI 'da yapılan BLAST sonuçlarına bakıldığında PPV izolatının % 99 oranında –T ırkı ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir

## Plum pox virus isolate KrMrAp504, complete genome

Sequence ID: [MF346280.1](#) Length: 9784 Number of Matches: 1

Range 1: 2960 to 3731 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1341 bits(726)	0.0	757/774(98%)	2/774(0%)	Plus/Plus
Query 4	66AAAAGATTCTCTGCAATCTTGGAAATCGCAGCGGTGGCGAAAAACATATACCAAAGCCCTT	63		
Sbjct 2960	66AAAAGATTCTCTGCAATCTTGGAAATCGCAGCGGTGGCGAAAAACATATACCAAAGCCCTT	3019		
Query 64	CATCCC6AAAAGACGCGAGATTTAGGAGGCGAGTACGACATCTCCGTTCCGGTCATTACT	123		
Sbjct 3020	CATCCC6AAAAGACGCGAGATTTAGGAGGCGAGTACGACATCTCCGTTCCGGTCATTACT	3079		
Query 124	TGGCAGTCAATACAAACGCCTGAAAAGACGTGGTTCGGCGAAAAAGAGACGACGTCGTTTG	183		
Sbjct 3080	TGGCAGTCAATACAAACGCCTGAAAAGACGTGGTTCGGCGAAAAAGAGACGACGTCGTTTG	3139		
Query 184	TTACACACACCAAGTCGATGGGAAAGCTATTCTGCAAAAGCTATCGAAATTTCCACAAGTT	243		
Sbjct 3140	TTACACACACCAAGTCGATGGGAAAGCTATTCTGCAAAAGCTATCGAAATTTCCACAAGTT	3199		
Query 244	TCTTCCAAGCACCTGAAAGATGTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTGCTTTCAAT	303		
Sbjct 3200	TCTTCCAAGCACCTGAAAGATGTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTGCTTTCAAT	3259		
Query 304	AGGAGCCACATGTAATTCAATGATTAATGAACACAAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGA	363		
Sbjct 3260	AGGAGCCACATGCAATTCATGATTAATGAACACAAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGA	3319		
Query 364	TCGTGAAGATAAGAAAAGATTCAAGAGATTGCAAGTTTTGCACACGAGACTATCAGAAAA	423		
Sbjct 3320	TCGTGAAGATAAGAAAAGATTCAAGAGATTGCAAGTTTTGCACACGAGACTATCAGAAAA	3379		
Query 424	G6TTGGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGAATATGTGCAAGGTGAAAAACCTGA	483		
Sbjct 3380	G6TTGGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGAATATGTGCAAGGTGAAAAACCTGA	3439		
Query 484	TCTATTGAAAACATGCGAGGACTTGATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAAGTAA	543		
Sbjct 3440	TCTATTGAAAACATGCGAGGACTTGATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAAGTAA	3499		
Query 544	AAGAGATTCACAAGCTAGTCTGGAACGAGTCGTAGCATTGTTAGCCCTTGTATGATGCT	603		
Sbjct 3500	AAGAGATTCACAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTGTTAGCCCTTGTATGATGCT	3559		
Query 604	TTTTGACTCGGAGCGGAGTGATGGTGTACAAAAATCTCAATAAGCTTAAG66CGTCAT	663		
Sbjct 3560	TTTTGACTCGGAGCGGAGTGATGGTGTACAAAAATCTCAATAAGCTTAAG66CGTCAT	3619		
Query 664	GGCAAGAATCGATCAGACTGTTCCACCATCAAAGTTTTGGACGATATTGAAGACATGCTGG	723		
Sbjct 3620	GGCAAGTATCGATCAGACTGTTCCACCATCAAAG-TTTGGACGACATTGAAGACATGTTGG	3678		
Query 724	ACGAAAAAGAGATGACAGTCGATTTGCTTGGCAAMTTAATGAASTYSCACCA	777		
Sbjct 3679	ACGAAAAAGAGTTGACAGTCGATT-TTGTCTTGGCAAGTAAATGAAGTTGACCA	3731		

Myrobalan 29C 58 kodlu pozitif anaç örneğinin NCBI 'da yapılan BLAST sonuçlarına bakıldığında PPV izolatının % 98 oranında -T ırkı ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir



## Plum pox virus isolate PI45 polyprotein gene, partial cds

Sequence ID: [EU734802.1](#) Length: 4550 Number of Matches: 1

Range 1: 2913 to 3687 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1404 bits(760)	0.0	770/775(99%)	0/775(0%)	Plus/Plus
Query 1	AAGATTCTCTGCAATCTTGGAAATCGCAGCGGTGGCGAAAAACATATACCAAAGCCCTTTCAT	60		
Sbjct 2913	AAGATTCTCTGCAATCTTGGAAATCGCAGCGGTGGCGAAAAACATATACCAAAGCCCTTTCAT	2972		
Query 61	CCCGAAAGACGCGCAGCAGATTTAGGAGGCAGGTACGACATCTCCGTTCCGGTCATTACTTGG	120		
Sbjct 2973	CCCGAAAGACGCGCAGCAGATTTAGGAGGCAGGTACGACATCTCCGTTCCGGTCATTACTTGG	3032		
Query 121	CAGTCAATACAACGCCTGAAAGACGTGGTTCGGCGGAAAAAGAGACGACGTCGTTTGTTA	180		
Sbjct 3033	CAGTCAATACAACGCCTGAAAGACGTGGTTCGGCGGAAAAAGAGACGACGTCGTTTGTTA	3092		
Query 181	CACACACCAGTCGATGGGGAAGCTATTCTGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCT	240		
Sbjct 3093	CACACACCAGTCGATGGGGAAGCTATTCTGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCT	3152		
Query 241	TCCAAGCACTCTGAAGATGTTTGACATGCTCATTATATTTGGTCTCTGCTTTCAATAGG	300		
Sbjct 3153	TCCAAGCACTCTGAAGATGTTTGACATGCTCATTATATTTGGTCTCTGCTTTCAATAGG	3212		
Query 301	AGCCACATGTAATTC AATGATTAATGAACACAAACATTTAAAGCAAAGTTGCTGCTGATCG	360		
Sbjct 3213	AGCCACATGCAATTC AATGATTAATGAACACAAACATTTAAAGCAAAGTTGCTGCTGATCG	3272		
Query 361	TGAAGATAAGAAAAGATTCAAGAGATTGCAGGTTTTGCACACGAGACTATCAGAAAAAGGT	420		
Sbjct 3273	TGAAGATAAGAAAAGATTCAAGAGATTGCAGGTTTTGCACACGAGACTATCAGAAAAAGGT	3332		
Query 421	TGGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGAATATGTGCAAGGTGAAAACCTGATCT	480		
Sbjct 3333	TGGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGAATATGTGCAAGGTGAAAACCTGATCT	3392		
Query 481	ATTGAAACATGCGAGGACTTGATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAGTAAAAAG	540		
Sbjct 3393	ATTGAAACATGCGAGGACTTGATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAGTAAAAAG	3452		
Query 541	AGATTCACAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTTGTAGCCCTTGTTATGATGCTTTT	600		
Sbjct 3453	AGATTCACAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTTGTAGCCCTTGTTATGATGCTTTT	3512		
Query 601	TGACTCGGAGCGGAGTGATGGTGTTCACAAAATCCCAATAAGCTTAAGGGTGTCATGGG	660		
Sbjct 3513	TGACTCGGAGCGGAGTGATGGTGTTCACAAAATCCCAATAAGCTTAAGGGTGTCATGGG	3572		
Query 661	AAGTATCGATCAGACTGTTCAACATCAAAGTTTGGACGACATTGAAGACATGTTGGACGA	720		
Sbjct 3573	AAGTATCGATCAGACTGTTCAACATCAAAGTTTGGACGACATTGAAGACATGTTGGACGA	3632		
Query 721	AAAGAAGTTGACAGTCGATTTTGTCTTGCAAAGTAATGAAGTTGCACCAACTGTC	775		
Sbjct 3633	AAAGAAGTTGACAGTCGATTTTGTCTTGCAAAGTAATGAAGTTGCACCAACTGTC	3687		

Myrobalan 29C 44 kodlu pozitif anaç örneğinin NCBI 'da yapılan BLAST sonuçlarına bakıldığında PPV izolatının % 99 oranında -T ırkı ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir

## Plum pox virus isolate KrMrAp504, complete genome

Sequence ID: [MF346280.1](#) Length: 9784 Number of Matches: 1

Range 1: 2963 to 3702 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1334 bits(722)	0.0	734/740(99%)	0/740(0%)	Plus/Plus
Query 1	AAGATTCTCTGCAATCTTGGAATCGCAGCGGTGGCGAAAAACATATACCAAAGCCTTTTCAT	60		
Sbjct 2963	AAGATTCTCTGCAATCTTGGAATCGCAGCGGTGGCGAAAAACATATACCAAAGCCTTTTCAT	3022		
Query 61	CCCCAAAAGACGCAGCAGATTTAGGAGGCAAGTACGACATCTCCGTTCCGGTCATTACTTTGG	120		
Sbjct 3023	CCCCAAAAGACGCAGCAGATTTAGGAGGCAAGTACGACATCTCCGTTCCGGTCATTACTTTGG	3082		
Query 121	CAGTCAATACAAAACGCCTGAAAAGACGTGGTTCCGGCGAAAAAGAGACGACGTCGTTTGTTA	180		
Sbjct 3083	CAGTCAATACAAAACGCCTGAAAAGACGTGGTTCCGGCGAAAAAGAGACGACGTCGTTTGTTA	3142		
Query 181	CACACACCAGTCGATGGGGAAGCTATTCTGCAAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCT	240		
Sbjct 3143	CACACACCAGTCGATGGGGAAGCTATTCTGCAAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCT	3202		
Query 241	TCCAAGCACTCTGAAAGATGTTTGACATGCTCATTATATTTGGTCTCTTGCTTTCAATAGG	300		
Sbjct 3203	TCCAAGCACTCTGAAAGATGTTTGACATGCTCATTATATTTGGTCTCTTGCTTTCAATAGG	3262		
Query 301	AGCCACATGTAATTTCAATGATTAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCG	360		
Sbjct 3263	AGCCACATGTAATTTCAATGATTAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCG	3322		
Query 361	TGAAGATAAGAAAAGATTCAAGAGATTGCAGGTTTTGCACACGAGACTATCAGAAAAGGT	420		
Sbjct 3323	TGAAGATAAGAAAAGATTCAAGAGATTGCAGGTTTTGCACACGAGACTATCAGAAAAGGT	3382		
Query 421	TGGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGAATATGTGCAAGGTGAAAACCTGATCT	480		
Sbjct 3383	TGGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGAATATGTGCAAGGTGAAAACCTGATCT	3442		
Query 481	ATTGAAACATGCAGAGGACTTGATCGGAGACGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAGTAAAAG	540		
Sbjct 3443	ATTGAAACATGCAGAGGACTTGATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAGTAAAAG	3502		
Query 541	AGATTCAACAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTGTAAGCCCTTGTATGATGCTTTT	600		
Sbjct 3503	AGATTCAACAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTGTAAGCCCTTGTATGATGCTTTT	3562		
Query 601	TGACTCGGAGCGGAGTGATGGTGTTCACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGTGTGATGGG	660		
Sbjct 3563	TGACTCGGAGCGGAGTGATGGTGTTCACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGTGTGATGGG	3622		
Query 661	AAGTATCGATCAGACTGTTACCATCAAAGTTTGGACGACATTGAAAGACATGTTGGACGA	720		
Sbjct 3623	AAGTATCGATCAGACTGTTACCATCAAAGTTTGGACGACATTGAAAGACATGTTGGACGA	3682		
Query 721	AAAGAAAGTTGACAGTCGATT	740		
Sbjct 3683	AAAGAAAGTTGACAGTCGATT	3702		

Myrobalan 29B 72 kodlu pozitif anaç örneğinin NCBI 'da yapılan BLAST sonuçlarına bakıldığında PPV izolatının % 99 oranında –T ırkı ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir

## Plum pox virus isolate KrMrAp504, complete genome

Sequence ID: [MF346280.1](#) Length: 9784 Number of Matches: 1

Range 1: 2963 to 3735 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1400 bits(758)	0.0	768/773(99%)	0/773(0%)	Plus/Plus
Query 1	AAGATTCTCTGCAATCTTGGAAATCGACGCGGTGGCGAAAAACATATACAAAAGCCTTTTCAT	60		
Sbjct 2963	AAGATTCTCTGCAATCTTGGAAATCGACGCGGTGGCGAAAAACATATACAAAAGCCTTTTCAT	3022		
Query 61	CCC6AAAAGACGACGAGATTAGGAGGACAGGTACGACATCTCCGTTCCGGTCATTACTTTGG	120		
Sbjct 3023	CCC6AAAAGACGACGAGATTAGGAGGACAGGTACGACATCTCCGTTCCGGTCATTACTTTGG	3082		
Query 121	CAGTCAATACAAAACGCCTGAAAAGACGTGGTTCCGGCGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTTA	180		
Sbjct 3083	CAGTCAATACAAAACGCCTGAAAAGACGTGGTTCCGGCGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTTA	3142		
Query 181	CACACACCAGTCGATGGGGAAAGCTATTCTGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCT	240		
Sbjct 3143	CACACACCAGTCGATGGGGAAAGCTATTCTGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCT	3202		
Query 241	TCCAAGCACTCTGAAGATGTTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTGCTTTCAATAGG	300		
Sbjct 3203	TCCAAGCACTCTGAAGATGTTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTGCTTTCAATAGG	3262		
Query 301	AGCCACATGTAATTCAATGATTAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCG	360		
Sbjct 3263	AGCCACATGTAATTCAATGATTAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCG	3322		
Query 361	TGAAGATAAGAAAAGATTCAAGAGATTGCAGGTTTGCACACGAGACTATCAGAAAAGGT	420		
Sbjct 3323	TGAAGATAAGAAAAGATTCAAGAGATTGCAGGTTTGCACACGAGACTATCAGAAAAGGT	3382		
Query 421	TGGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGAATATGTGCAAGGTGAAAACCCGTGATCT	480		
Sbjct 3383	TGGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGAATATGTGCAAGGTGAAAACCCGTGATCT	3442		
Query 481	ATTGAAACATGACAGAGGACTTGATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAAGTAAAAAG	540		
Sbjct 3443	ATTGAAACATGACAGAGGACTTGATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAAGTAAAAAG	3502		
Query 541	AGATTACAAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTATGATGCTTTT	600		
Sbjct 3503	AGATTACAAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTATGATGCTTTT	3562		
Query 601	TGACTCGGAGCGGAGTGATGGTGTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGTGCATGGG	660		
Sbjct 3563	TGACTCGGAGCGGAGTGATGGTGTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGTGCATGGG	3622		
Query 661	AAGTATCGATCAGACTGTTCAACATCAAAGTTTGGACGATATTGAAGACATGTTGGACGA	720		
Sbjct 3623	AAGTATCGATCAGACTGTTCAACATCAAAGTTTGGACGATATTGAAGACATGTTGGACGA	3682		
Query 721	AAAAGAAAGTTGACAGTCGATTTGTCTTGCAAAGTAATGAAAGTTGCACCAACTG	773		
Sbjct 3683	AAAAGAAAGTTGACAGTCGATTTGTCTTGCAAAGTAATGAAAGTTGCACCAACTG	3735		

Nemaguard 65 kodlu pozitif anaç örneğinin NCBI 'da yapılan BLAST sonuçlarına bakıldığında PPV izolatının % 99 oranında –T ırkı ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir

## Plum pox virus isolate PL45 polyprotein gene, partial cds

Sequence ID: [EU734802.1](#) Length: 4550 Number of Matches: 1

Range 1: 2877 to 3686 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1452 bits(786)	0.0	801/810(99%)	0/810(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATTGGAGCAGGCTTGGAGAGAATTAAGTTGGTGGGAAAGATTCTCTGCAATCTTGGAAATC	60		
Sbjct 2877	ATTGGAGCAGGCTTGGAGAGAATTAAGTTGGTGGGAAAGATTCTCTGCAATCTTGGAAATC	2936		
Query 61	GCAGCGGTGGCGAAAAACATATACCAAAGCCCTTTCATCCCAGAAAGACGCAGCAGATTTAGG	120		
Sbjct 2937	GCAGCGGTGGCGAAAAACATATACCAAAGCCCTTTCATCCCAGAAAGACGCAGCAGATTTAGG	2996		
Query 121	AGGCAGGTACGACATCTCCGTTCCGGTCATTACTTGGCAGTCAATACAAAACGCCTGAAAGA	180		
Sbjct 2997	AGGCAGGTACGACATCTCCGTTCCGGTCATTACTTGGCAGTCAATACAAAACGCCTGAAAGA	3056		
Query 181	CGTGGTTCGGCGGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTACACACACCAAGTCGATGGGGAAGCT	240		
Sbjct 3057	CGTGGTTCGGCGGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTACACACACCAAGTCGATGGGGAAGCT	3116		
Query 241	ATTCTGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCTTCCAAGCACTCTGAAGATGTTTGA	300		
Sbjct 3117	ATTCTGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCTTCCAAGCACTCTGAAGATGTTTGA	3176		
Query 301	CATGCTCATCATATTTGGTCTCTTCTTCAATAGGAGCCACATGTAATCAATGATCAA	360		
Sbjct 3177	CATGCTCATCATATTTGGTCTCTTCTTCAATAGGAGCCACATGTAATCAATGATCAA	3236		
Query 361	TGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGTGAAGATAAGAAAAGATTCAAGAG	420		
Sbjct 3237	TGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGTGAAGATAAGAAAAGATTCAAGAG	3296		
Query 421	ATTGCAGGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAGGTTGGTTGCACCAACACAGCGGATGA	480		
Sbjct 3297	ATTGCAGGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAGGTTGGTTGCACCAACACAGCGGATGA	3356		
Query 481	ATTTCTTGAATATGTGCAAGGTGAAAACCCCTGATCTATTGAAACATGCAGAGGACTTGAT	540		
Sbjct 3357	ATTTCTTGAATATGTGCAAGGTGAAAACCCCTGATCTATTGAAACATGCAGAGGACTTGAT	3416		
Query 541	TGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAGTAAAAGAGATTACAAGCTARTCTGGAACG	600		
Sbjct 3417	TGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAGTAAAAGAGATTACAAGCTARTCTGGAACG	3476		
Query 601	AGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTATGATGCTTTTACTCGGAGCGGAGTATGGTGT	660		
Sbjct 3477	AGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTATGATGCTTTTACTCGGAGCGGAGTATGGTGT	3536		
Query 661	TTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGCGTCATGGGAAGTATCGATCAGACTGTTACCA	720		
Sbjct 3537	TTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGCGTCATGGGAAGTATCGATCAGACTGTTACCA	3596		
Query 721	CCAAAGTTTGGACGACATTGAAGACATGTTGGATGAAAAGAAAGTTGACAGTCGATTTGT	780		
Sbjct 3597	TCAAAGTTTGGACGACATTGAAGACATGTTGGACGAAAAGAAAGTTGACAGTCGATTTGT	3656		
Query 781	CTTGCAAAGTAATGAASTTGCACCAACTGT	810		
Sbjct 3657	CTTGCAAAGTAATGAASTTGCACCAACTGT	3686		

Nemaguard 148 kodlu pozitif anaç örneğinin NCBI 'da yapılan BLAST sonuçlarına bakıldığında PPV izolatının % 99 oranında –T ırkı ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir



### Plum pox virus isolate AnYnAp129, complete genome

Sequence ID: [MF346257.1](#) Length: 9784 Number of Matches: 1

Range 1: 2963 to 3699 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1323 bits(716)	0.0	730/737(99%)	2/737(0%)	Plus/Plus
Query 1	AAGATTCKCTGC - ATCTTGGAAATCGCAGCGGTGGCGAAAAACATATACCAAAGCCCTTCAT	59		
Sbjct 2963	AAGATTCTCTGCAATCTTGGAAATCGCAGCGGTGGCGAAAAACATATACCAAAGCCCTTCAT	3022		
Query 60	CCCGAAAAGACGCAGCAGATTTAGGAGGCAGGTACGACATCTCCGTTCCGGTCATTACTTGG	119		
Sbjct 3023	CCCGAAAAGACGCAGCAGATTTAGGAGGCAGGTACGACATCTCCGTTCCGGTCATTACTTGG	3082		
Query 120	CAGTCAATACAAACGCCTGAAAGACGTGGTTTCGGCGGAAAAAGAGACGACGTGTTTGTTA	179		
Sbjct 3083	CAGTCAATACAAACGCCTGAAAGACGTGGTTTCGGCGGAAAAAGAGACGACGTGTTTGTTA	3142		
Query 180	CACACACCAAGTCGATGGGGAAAGCTATTCTGCAAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCT	239		
Sbjct 3143	CACACACCAAGTCGATGGGGAAAGCTATTCTGCAAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCT	3202		
Query 240	TCCAAGCACTCTGAAGATGTTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTGCTTTCAATAGG	299		
Sbjct 3203	TCCAAGCACTCTGAAGATGTTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTGCTTTCAATAGG	3262		
Query 300	AGCCACATGTAATTCAATGATTAAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCG	359		
Sbjct 3263	AGCCACATGCAATTCATGATTAAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCG	3322		
Query 360	TGAAGATAAGAAAAGATTCAAGAGATTGCAAGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAGGT	419		
Sbjct 3323	TGAAGATAAGAAAAGATTCAAGAGATTGCAAGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAGGT	3382		
Query 420	TGGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGAATATGTGCAAGGTGAAAAACCTGATCT	479		
Sbjct 3383	TGGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGAATATGTGCAAGGTGAAAAACCTGATCT	3442		
Query 480	ATTGAAACATGCAGAGGACTTGATTGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAGTAAAAAG	539		
Sbjct 3443	ATTGAAACATGCAGAGGACTTGATTGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAGTAAAAAG	3502		
Query 540	AGATTCACAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTTATGATGCTTTT	599		
Sbjct 3503	AGATTCACAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTTATGATGCTTTT	3562		
Query 600	TGACTCGGAGCGGAGTGATGGTGTTCACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGCGTCATGGG	659		
Sbjct 3563	TGACTCGGAGCGGAGTGATGGTGTTCACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGCGTCATGGG	3622		
Query 660	AAGTATCGATCAGACTGTTTCATCATCAAAGTTTGGACGACATTGAAGACATGTTGGACGA	719		
Sbjct 3623	AAGTATCGATCAGACTGTTTCATCATCAAAGTTTGGACGACATTGAAGACATGTTGGACGA	3682		
Query 720	AAAGAAAGT - GACAGTCG 735			
Sbjct 3683	AAAGAAAGTTGACAGTCG 3699			

Nemaguard 44 kodlu pozitif anaç örneğinin NCBI 'da yapılan BLAST sonuçlarına bakıldığında PPV izolatının % 99 oranında -T ırkı ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir

Şekil 4.10. Deneme parselinde PPV ile bulaşık olduğu belirlenen Nemaguard, Myrobolan 29B ve Myrobolan 29C anaçlarının BLAST analiz sonuçları

Anaç deneme parselinin etrafında bulunan DAS-ELISA testi sonucunda pozitif çıkan *Prunus* türlerinden alınan örneklerin sekans analizleri sonucu gelen baz dizileri NCBI 'da BLAST programı ile ırk düzeyinde belirlenmiştir. Elde edilen sekans sonuçlarının GenBank'a kayıtlı sekans sonuçları ile karşılaştırılmaları sonucunda pozitif

anaç örneklerinin hepsinin PPV-T ırkı ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.11).

**Plum pox virus isolate AnYnAp129, complete genome**

Sequence ID: [MF346257.1](#) Length: 9784 Number of Matches: 1

Range 1: 2964 to 3699 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1330 bits(720)	0.0	730/736(99%)	0/736(0%)	Plus/Plus
Query 1	AGATTCTCTGCAATCTTGGAAATCGCAGCGGTGGCGAAAAACATATACCAAAGCCCTTTCATC	60		
Sbjct 2964	AGATTCTCTGCAATCTTGGAAATCGCAGCGGTGGCGAAAAACATATACCAAAGCCCTTTCATC	3023		
Query 61	CCGAAAAGACGCAGCAGATTTAGGAGGCAAGGTACGACATCTCCGTTCCGGTCATTACTTGGC	120		
Sbjct 3024	CCGAAAAGACGCAGCAGATTTAGGAGGCAAGGTACGACATCTCCGTTCCGGTCATTACTTGGC	3083		
Query 121	AGTCAATACAAAACGCCTGAAAAGACGTGGTTCCGGCGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTAC	180		
Sbjct 3084	AGTCAATACAAAACGCCTGAAAAGACGTGGTTCCGGCGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTAC	3143		
Query 181	ACACACCAAGTCGATGGGGAAGCTATTCTGCAAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCTT	240		
Sbjct 3144	ACACACCAAGTCGATGGGGAAGCTATTCTGCAAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCTT	3203		
Query 241	CCAAGCACTCTGAAGATGTTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTGCTTTCAATAGGA	300		
Sbjct 3204	CCAAGCACTCTGAAGATGTTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTGCTTTCAATAGGA	3263		
Query 301	GCCACATGTAATTCAATGATTAATGAACACAAAACATTTAAAGCAAAGTTGCTGCTGATCGT	360		
Sbjct 3264	GCCACATGCAATTCAATGATTAATGAACACAAAACATTTAAAGCAAAGTTGCTGCTGATCGT	3323		
Query 361	GAAGATAAGAAAAGATTCAAGAGATTGCAGGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAGGTT	420		
Sbjct 3324	GAAGATAAGAAAAGATTCAAGAGATTGCAGGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAGGTT	3383		
Query 421	GGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGAATATGTGCAAGGTGAAAACCCCTGATCTA	480		
Sbjct 3384	GGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGAATATGTGCAAGGTGAAAACCCCTGATCTA	3443		
Query 481	TTGAAACATGCAGAGGACTTGATTGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAGTAAAAGA	540		
Sbjct 3444	TTGAAACATGCAGAGGACTTGATTGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAGTAAAAGA	3503		
Query 541	GATTCACAAGCTARTCTGGAACGAGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTATGATGCTTTTT	600		
Sbjct 3504	GATTCACAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTATGATGCTTTTT	3563		
Query 601	GACTCGGAGCGGAGTGATGGKGTTTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGCGTCATGGGA	660		
Sbjct 3564	GACTCGGAGCGGAGTGATGGTGTTTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGCGTCATGGGA	3623		
Query 661	AGTATCGATCAGACTGTTCAACCATCAAAGTCTGGACGACATTGAAGACATGTTGGACGAA	720		
Sbjct 3624	AGTATCGATCAGACTGTTCAACCATCAAAGTCTGGACGACATTGAAGACATGTTGGACGAA	3683		
Query 721	AAGAAGTTGACAGTCG	736		
Sbjct 3684	AAGAAGTTGACAGTCG	3699		

Anaç deneme parseli etrafında B15 (Şeftali) kodlu pozitif örneğin NCBI ‘da yapılan BLAST sonuçlarına bakıldığında PPV izolatının % 99 oranında –T ırkı ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir

## Plum pox virus isolate KrMrAp504, complete genome

Sequence ID: [MF346280.1](#) Length: 9784 Number of Matches: 1

Range 1: 2972 to 3695 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1290 bits(698)	0.0	716/725(99%)	3/725(0%)	Plus/Plus
Query 1	TGC-ATCTTGG-ATCGCAGCGGTGGCGAAAAACATATACCAAAGCCTTTCATCCCGAAAAG	58		
Sbjct 2972	TGCAATCTTGGAATCGCAGCGGTGGCGAAAAACATATACCAAAGCCTTTCATCCCGAAAAG	3031		
Query 59	CGCAGCAGATTTAGGAGGCAAGTACGACATCTCCGTTCCGGTCATTACTTGRCAAGTCAATA	118		
Sbjct 3032	CGCAGCAGATTTAGGAGGCAAGTACGACATCTCCGTTCCGGTCATTACTTGGCAGCCAATA	3091		
Query 119	CAAACGCCTGAAAGACGTGGTTCGGCGGAAAAAGAGACGACGTCGTTTGTACACACACCA	178		
Sbjct 3092	CAAACGCCTGAAAGACGTGGTTCGGCGGAAAAAGAGACGACGTCGTTTGTACACACACCA	3151		
Query 179	GTCGATGGGGAAGCTATTCTGCAAAAGCTATCGAAATTTCCACAAGTTTTCTTCCAAGCAC	238		
Sbjct 3152	GTCGATGGGGAAGCTATTCTGCAAAAGCTATCGAAATTTCCACAAGTTTTCTTCCAAGCAC	3211		
Query 239	TCTGAAGATGTTTGACATGCTCATATTTGGTCTCTTGTCTTCAATAGGAGCCACATG	298		
Sbjct 3212	TCTGAAGATGTTTGACATGCTCATATTTGGTCTCTTGTCTTCAATAGGAGCCACATG	3271		
Query 299	TAATTCAATGATTAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGTGAAGATAA	358		
Sbjct 3272	CAATTCAATGATTAATGAACACAAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGTGAAGATAA	3331		
Query 359	GAAAAGATTCAAGAGATTGCAGGTTTTGCACACGAGACTATCAGAAAAGTTGGTTGCAC	418		
Sbjct 3332	GAAAAGATTCAAGAGATTGCAGGTTTTGCACACGAGACTATCAGAAAAGTTGGTTGCAC	3391		
Query 419	ACCAACAGCGGATGAATTTCTTGAATATGTGCAAGGTGAAAACCTGATCTATTGAAAACA	478		
Sbjct 3392	ACCAACAGCGGATGAATTTCTTGAATATGTGCAAGGTGAAAACCTGATCTATTGAAAACA	3451		
Query 479	TGCAGAGGACTTGATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAAGTAAAAGAGATTCACA	538		
Sbjct 3452	TGCAGAGGACTTGATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAAGTAAAAGAGATTCACA	3511		
Query 539	AGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTATGATGCTTTTTGACTCGGA	598		
Sbjct 3512	AGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTATGATGCTTTTTGACTCGGA	3571		
Query 599	GCGGAGTGATGGTGTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGTGTGATGGGAAGTATCGA	658		
Sbjct 3572	GCGGAGTGATGGTGTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGTGTGATGGGAAGTATCGA	3631		
Query 659	TCAGACTGTTCAACATCAAAAGTTTGGACGMCATTGAAGACATGTTTGGACGAAAAGAAAT	718		
Sbjct 3632	TCAGACTGTTCAACATCAAAAGTTTGGACGACATTGAAGACATG-TTGGACGAAAAGAAAT	3690		
Query 719	TGACA 723			
Sbjct 3691	TGACA 3695			

Anaç deneme parseli etrafında B12 (Kayısı) kodlu pozitif örneğin NCBI 'da yapılan BLAST sonuçlarına bakıldığında PPV izolatının % 99 oranında –T ırkı ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir

## Plum pox virus isolate AnYnAp129, complete genome

Sequence ID: [MF346257.1](#) Length: 9784 Number of Matches: 1

Range 1: 2964 to 3700 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1315 bits(712)	0.0	731/740(99%)	4/740(0%)	Plus/Plus
Query 1	AGATTCTCTGCAATCTTGGGAATCGCAGCGGTGGCGA			60
Sbjct 2964	AGATTCTCTGCAATCTT-GGAATCGCAGCGGTGGCGA-AAACATATAACCAAGCCCTTCA			3021
Query 61	TCCCgAAAGACGcAGcAGATTTAGGAGGcAGGTACGACATCTCCGTTcGGTcATTACTTg			120
Sbjct 3022	TCCCgAAAGACGcAGcAGATTTAGGAGGcAGGTACGACATCTCCGTTcGGTcATTACTTg			3081
Query 121	GcAGTcAATAcAAAcGcCTGAAAGAcGTGgTTcGGcGGAAAGAGAcGAcGTCgTTTgTt			180
Sbjct 3082	GcAGTcAATAcAAAcGcCTGAAAGAcGTGgTTcGGcGGAAAGAGAcGAcGTCgTTTgTt			3141
Query 181	AcAcAcAcCAGTcGATgGGGAAgCTATTCTGcAAAGcTATcGGAAATTcCACAAGTTTTc			240
Sbjct 3142	AcAcAcAcCAGTcGATgGGGAAgCTATTCTGcAAAGcTATcGGAAATTcCACAAGTTTTc			3201
Query 241	TtCCAAgCAcTcTGAAGATgTTTGAcATgCTcATcATATTTGgTcTcTTGcTTTCAATAg			300
Sbjct 3202	TtCCAAgCAcTcTGAAGATgTTTGAcATgCTcATcATATTTGgTcTcTTGcTTTCAATAg			3261
Query 301	GAGCCAcATgTAATTCAATgATTAATGAACAcAAAcATTTAAAGCAAgTTGcTgCTgATc			360
Sbjct 3262	GAGCCAcATgTAATTCAATgATTAATGAACAcAAAcATTTAAAGCAAgTTGcTgCTgATc			3321
Query 361	GtGAAGATAAgAAAGATTCAAGAGATTGcAGgTTTTGTAcAcGAGAcTAcAGAAAGG			420
Sbjct 3322	GtGAAGATAAgAAAGATTCAAGAGATTGcAGgTTTTGTAcAcGAGAcTAcAGAAAGG			3381
Query 421	TtGgTTGcAcAcCAAcAGcGgATgAAATTTCTTGAATATgTgCAAgGTgAAAcCCCTGATc			480
Sbjct 3382	TtGgTTGcAcAcCAAcAGcGgATgAAATTTCTTGAATATgTgCAAgGTgAAAcCCCTGATc			3441
Query 481	TATTGAACATGcAGAGGAcTTGATTGGAGATGGGCAAgTTGTTGTCATCAAAgTAAAA			540
Sbjct 3442	TATTGAACATGcAGAGGAcTTGATCGGAGATGGGCAAgTTGTTGTCATCAAAgTAAAA			3501
Query 541	GAGATTcAcAAgCTAACTGGAACGAGTCGTAGcATTTGTAGCCCTTgTTATGATGcTTT			600
Sbjct 3502	GAGATTcAcAAgCTAACTGGAACGAGTCGTAGcATTTGTAGCCCTTgTTATGATGcTTT			3561
Query 601	TtGAcTcGgAGcGgAGTgATgGkGTTTAcAAATcCTCAATAAgCTTAAgGgGcTcATgG			660
Sbjct 3562	TtGAcTcGgAGcGgAGTgATgGgTgTTTAcAAATcCTCAATAAgCTTAAgGgGcTcATgG			3621
Query 661	SgAAgTAcGATcAGAcTgTTcACcATcAAAgTcTgGAcGAcATTGAAGAcATgTTgGAc			720
Sbjct 3622	-GAAGTAcGATcAGAcTgTTcACcATcAAAgTgTgGAcGAcATTGAAGAcATgTTgGAc			3680
Query 721	GAAAAGAAgT-GAcAGTcGA		739	
Sbjct 3681	GAAAAGAAgTTGAcAGTcGA		3700	

Anaç deneme parseli etrafında B7 (Kayısı) kodlu pozitif örneğin NCBI 'da yapılan BLAST sonuçlarına bakıldığında PPV izolatının % 99 oranında –T irki ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir



## Plum pox virus isolate AnYnAp129, complete genome

Sequence ID: [MF346257.1](#) Length: 9784 Number of Matches: 1

Range 1: 2962 to 3697 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1327 bits(718)	0.0	730/736(99%)	1/736(0%)	Plus/Plus
Query 1	AAAGATTCTCTGCAATCTTGGAAATCGCAGCGGTGGCGAAAAACATATACCAAAGCCCTTCA	60		
Sbjct 2962	AAAGATTCTCTGCAATCTTGGAAATCGCAGCGGTGGCGAAAAACATATACCAAAGCCCTTCA	3021		
Query 61	TCCCAGAAAGACGCAAGCAGATTTAGGAGGCAAGTACGACATCTCCGTTCCGGTCACTACTTG	120		
Sbjct 3022	TCCCAGAAAGACGCAAGCAGATTTAGGAGGCAAGTACGACATCTCCGTTCCGGTCACTACTTG	3081		
Query 121	GCAGTCAATACAAACGCCTGAAAGACGTGGTTCCGGCGAAAAAGAGACGACGTCGTTTGT	180		
Sbjct 3082	GCAGTCAATACAAACGCCTGAAAGACGTGGTTCCGGCGAAAAAGAGACGACGTCGTTTGT	3141		
Query 181	ACACACACCAGTCGATGGGGAAGCTATTCTGCAAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTT	240		
Sbjct 3142	ACACACACCAGTCGATGGGGAAGCTATTCTGCAAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTT	3201		
Query 241	TTCCAAGCACTCTGAAGATGTTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTGCTTTCAATAG	300		
Sbjct 3202	TTCCAAGCACTCTGAAGATGTTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTGCTTTCAATAG	3261		
Query 301	GAGCCACATGTAATTCAATGATTAATGAACACAAAACATTTAAAGCAAAGTTGCTGCTGATC	360		
Sbjct 3262	GAGCCACATGTAATTCAATGATTAATGAACACAAAACATTTAAAGCAAAGTTGCTGCTGATC	3321		
Query 361	GTGAAGATAAGAAAAGATTCAAGAGATTGCAAGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAGG	420		
Sbjct 3322	GTGAAGATAAGAAAAGATTCAAGAGATTGCAAGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAGG	3381		
Query 421	TTGTTGACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGAATATGTGCAAGGTGAAAACCCCTGATC	480		
Sbjct 3382	TTGTTGACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGAATATGTGCAAGGTGAAAACCCCTGATC	3441		
Query 481	TATTGAAACATGCAGAGGACTTGATTGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAGTAAAA	540		
Sbjct 3442	TATTGAAACATGCAGAGGACTTGATTGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAGTAAAA	3501		
Query 541	GAGATTCACAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTATGATGCTTT	600		
Sbjct 3502	GAGATTCACAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTATGATGCTTT	3561		
Query 601	TTGACTCGGAGCGGAGTGATGGKTTTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGCGTCATGG	660		
Sbjct 3562	TTGACTCGGAGCGGAGTGATGGKTTTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGCGTCATGG	3621		
Query 661	GAAATATCGATCAGACTGTTCCACATCAAAGTCTGGACGACATTGAAGACATGTTGGACG	720		
Sbjct 3622	GAAATATCGATCAGACTGTTCCACATCAAAGTCTGGACGACATTGAAGACATGTTGGACG	3681		
Query 721	AAAAAGAGT-GACAAT 735			
Sbjct 3682	AAAAAGAGTTGACAAT 3697			

Anaç deneme parseli etrafında B16 (Erik) kodlu pozitif örneğin NCBI 'da yapılan BLAST sonuçlarına bakıldığında PPV izolatının % 99 oranında –T ırkı ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir

## Plum pox virus isolate AnYnAp129, complete genome

Sequence ID: [MF346257.1](#) Length: 9784 Number of Matches: 1

Range 1: 2967 to 3701 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1323 bits(716)	0.0	728/735(99%)	0/735(0%)	Plus/Plus
Query 3	TTCTCTGCAATCTTGGAAATCGCAGCGGTGGCGAAAAACATATACCAAAGCCCTTCATCCCG	62		
Sbjct 2967	TTCTCTGCAATCTTGGAAATCGCAGCGGTGGCGAAAAACATATACCAAAGCCCTTCATCCCG	3026		
Query 63	AAAGACGCAGCAGATTTAGGAGGCAAGTACGACATCTCCGTTCCGGTCATTACTTGGCAGT	122		
Sbjct 3027	AAAGACGCAGCAGATTTAGGAGGCAAGTACGACATCTCCGTTCCGGTCATTACTTGGCAGT	3086		
Query 123	CAATACAAACGCCTGAAAGACGTGGTTCCGGCGAAAAAGAGACGACGTCGTTTGTACACA	182		
Sbjct 3087	CAATACAAACGCCTGAAAGACGTGGTTCCGGCGAAAAAGAGACGACGTCGTTTGTACACA	3146		
Query 183	CACCAGTCGATGGGGAAGCTATTCTGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCTTCCA	242		
Sbjct 3147	CACCAGTCGATGGGGAAGCTATTCTGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCTTCCA	3206		
Query 243	AGCACTCTGAAGATGTTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTGCTTTCAATAGGAGCC	302		
Sbjct 3207	AGCACTCTGAAGATGTTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTGCTTTCAATAGGAGCC	3266		
Query 303	ACATGTAATTCATGATTAATGAACACAAACATYAAAAGCAAAGTTGCTGCTGATCGTGAA	362		
Sbjct 3267	ACATGCAATTCATGATTAATGAACACAAACATTTAAAAGCAAAGTTGCTGCTGATCGTGAA	3326		
Query 363	GATAAGAAAAGATTCAAGAGATTGCAGGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAAGTTGGT	422		
Sbjct 3327	GATAAGAAAAGATTCAAGAGATTGCAGGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAAGTTGGT	3386		
Query 423	TGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGAATATGTTCAAAGTTGAAAAACCTGATCTATTG	482		
Sbjct 3387	TGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGAATATGTTCAAAGTTGAAAAACCTGATCTATTG	3446		
Query 483	AAACATGCAGAGGACTTGATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAGAGTAAAAGAGAT	542		
Sbjct 3447	AAACATGCAGAGGACTTGATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAGAGTAAAAGAGAT	3506		
Query 543	TCACAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTATGATGCTTTTTGAC	602		
Sbjct 3507	TCACAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTATGATGCTTTTTGAC	3566		
Query 603	TCGGAGCGGAGCGATGGTGTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGCGTCATGGGAAGT	662		
Sbjct 3567	TCGGAGCGGAGCGATGGTGTACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGCGTCATGGGAAGT	3626		
Query 663	ATCGATCAGACTGTTACCACATCAAAGTTTGGAYGACATTGAAGACATGTTGGACGAAAAG	722		
Sbjct 3627	ATCGATCAGACTGTTACCACATCAAAGTTTGGACGACATTGAAGACATGTTGGACGAAAAG	3686		
Query 723	AAGTTGACAGTCGAT	737		
Sbjct 3687	AAGTTGACAGTCGAT	3701		

Anaç deneme parseli etrafında B14 (Erik) kodlu pozitif örneğin NCBI ‘da yapılan BLAST sonuçlarına bakıldığında PPV izolatının % 99 oranında –T ırkı ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir

### Plum pox virus isolate AnYnAp129, complete genome

Sequence ID: [MF346257.1](#) Length: 9784 Number of Matches: 1

Range 1: 2964 to 3701 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1310 bits(709)	0.0	728/738(99%)	1/738(0%)	Plus/Plus
Query 1	AGATTCKCTGC-ATCTTGGAAATCGCAGCGGTGGCGAAAAACATATACCAAAGCCCTTCATC	59		
Sbjct 2964	AGATTCTCTGCAATCTTGGAAATCGCAGCGGTGGCGAAAAACATATACCAAAGCCCTTCATC	3023		
Query 60	CCGAAAAGACGCAGCAGATTTAGGAGGCAAGGTACGATATCTCTGTTCCGGTCATTACTTGGC	119		
Sbjct 3024	CCGAAAAGACGCAGCAGATTTAGGAGGCAAGGTACGACATCTCCGTTCCGGTCATTACTTGGC	3083		
Query 120	AGTCAATACAAAACGCCTGAAAAGACGTGGTTCCGGCGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTAC	179		
Sbjct 3084	AGTCAATACAAAACGCCTGAAAAGACGTGGTTCCGGCGAAAAGAGACGACGTCGTTTGTAC	3143		
Query 180	ACACACCAGTCGATGGGGAAGCTATTCTGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCTT	239		
Sbjct 3144	ACACACCAGTCGATGGGGAAGCTATTCTGCAAAGCTATCGGAATTTCCACAAGTTTTCTT	3203		
Query 240	CCAAGCACTCTGAAGATGTTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTGCTTTCAATAGGA	299		
Sbjct 3204	CCAAGCACTCTGAAGATGTTTGACATGCTCATCATATTTGGTCTCTTGCTTTCAATAGGA	3263		
Query 300	GCCACATGTAATTCAATGATTAATGAGCACAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGT	359		
Sbjct 3264	GCCACATGCAATTCAATGATTAATGAACACAACATTTAAAGCAAGTTGCTGCTGATCGT	3323		
Query 360	GAAGATAAGAAAAGATTCAAGAGATTGCAGGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAGGTT	419		
Sbjct 3324	GAAGATAAGAAAAGATTCAAGAGATTGCAGGTTTTGTACACGAGACTATCAGAAAAGGTT	3383		
Query 420	GGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGAATATGTGCAAGGTGAAAACCTGATCTA	479		
Sbjct 3384	GGTTGCACACCAACAGCGGATGAATTTCTTGAATATGTGCAAGGTGAAAACCTGATCTA	3443		
Query 480	CTGAAACATGCAGAGGACTTGATTGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAGTAAAAGA	539		
Sbjct 3444	TTGAAACATGCAGAGGACTTGATCGGAGATGGGCAAGTTGTTGTGCATCAAAGTAAAAGA	3503		
Query 540	GATTCACAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTATGATGCTTTTT	599		
Sbjct 3504	GATTCACAAGCTAATCTGGAACGAGTCGTAGCATTGTAGCCCTTGTATGATGCTTTTT	3563		
Query 600	GACTCGGAGCGGAGTGATGGTGTTCACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGCGTCATGGGA	659		
Sbjct 3564	GACTCGGAGCGGAGTGATGGTGTTCACAAAATCCTCAATAAGCTTAAGGGCGTCATGGGA	3623		
Query 660	AGTATCGATCAGACTGTTACCCATCAAAGTTTGGACGACATTGAAGACATGTTGGACGAA	719		
Sbjct 3624	AGTATCGATCAGACTGTTACCCATCAAAGTTTGGACGACATTGAAGACATGTTGGACGAA	3683		
Query 720	AAGAAGTGTGACAGTCGAT	737		
Sbjct 3684	AAGAAGTGTGACAGTCGAT	3701		

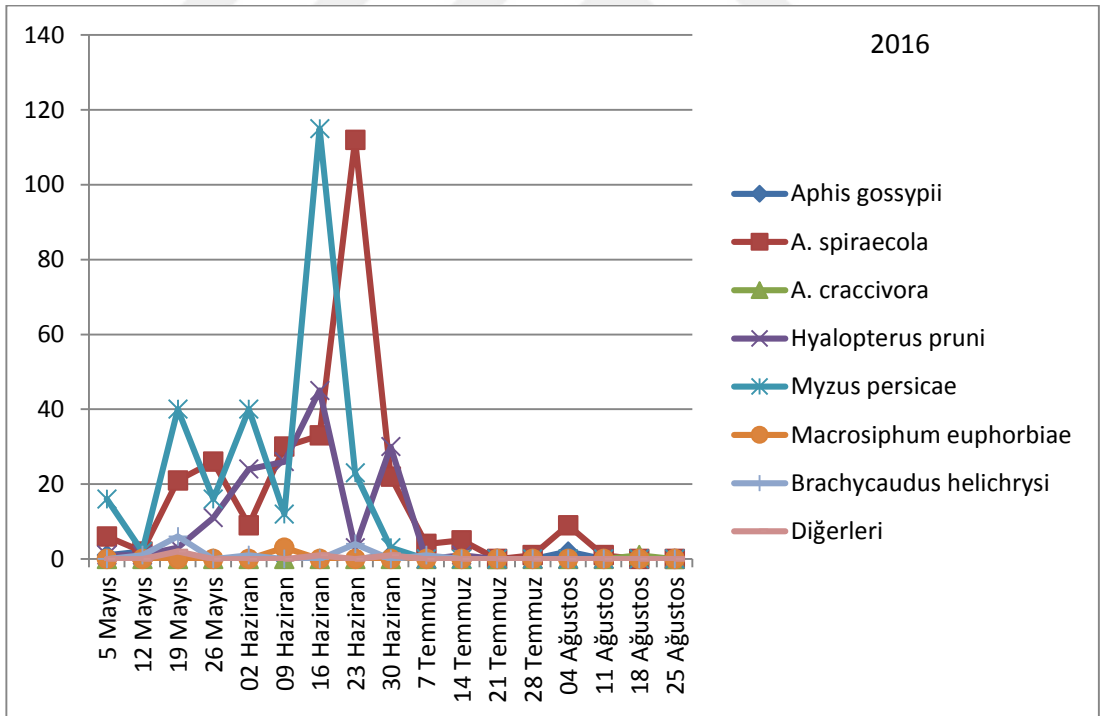
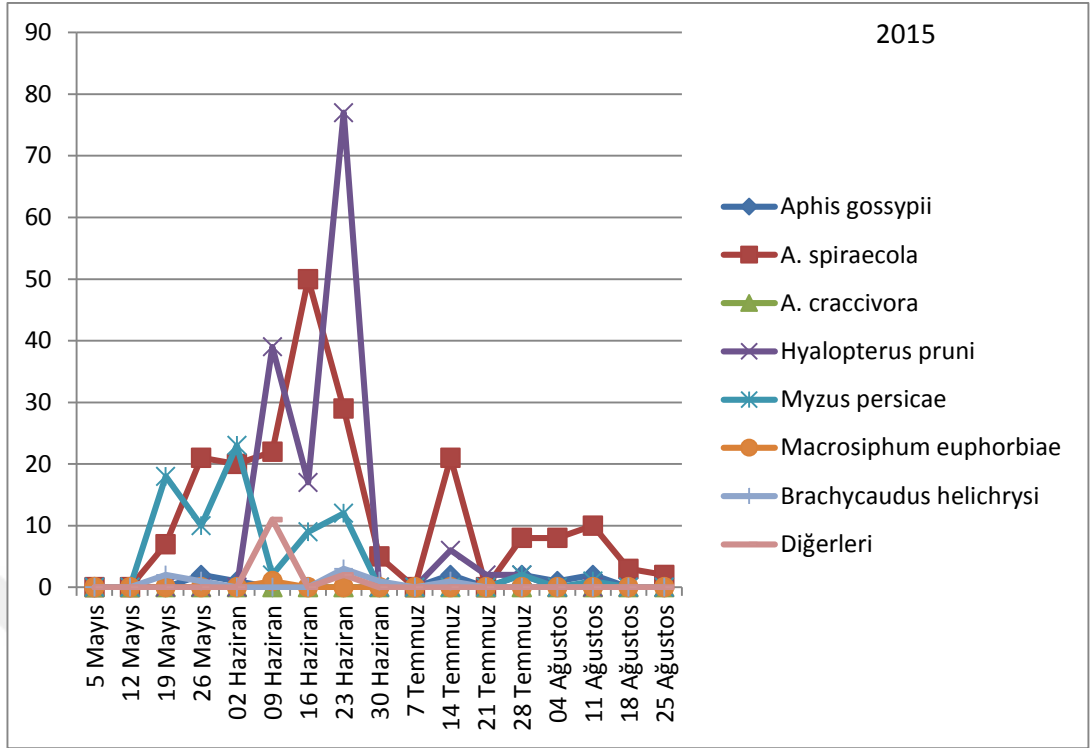
Anaç deneme parseli etrafında B4 (Erik) kodlu pozitif örneğin NCBI 'da yapılan BLAST sonuçlarına bakıldığında PPV izolatının % 99 oranında –T ırkı ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir

Şekil 4.11. Anaç deneme parseli etrafında PPV ile bulaşık olduğu belirlenen Prunus türlerinin BLAST analiz sonuçları

PPV ile bulaşık olduğu belirlenen Prunus anaçları ve çeşitlerinin sekans analiz sonuçları denemenin kurulduğu Kayseri ili Talas ilçesindeki ev bahçesinde PPV-T ırkının yaygın olduğunu göstermiştir. İç Anadolu Bölgesi'nde ırk dağılımının belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalar sonucunda PPV-M, -D ırklarının açık bahçelerde, -T ırkının ise ev bahçelerinde yaygın olduğu belirlenmiştir (Ceylan ve ark., 2013a; Gürcan ve ark., 2013a; Ceylan ve ark., 2013b; Gürcan ve Ceylan, 2016; Ulubaş ve ark., 2009). Yapılan çalışmalar ve bizim denememizden elde ettiğimiz sonuçlar önceki çalışmalarla büyük ölçüde benzerlik göstermiştir.

#### **4.3.3. Afit Türlerinin Teşhisi**

İlkbaharda Mayıs ayının ilk haftasından başlamak üzere Ağustos ayının son haftasına kadar yapışkan sürgün yöntemiyle anaçlar üzerindeki afit popülasyonu izlenmiştir. Buna göre 2015 ve 2016 yıllarında yürütülen bu çalışmada Mayıs ayının ilk haftası afit popülasyonu oldukça düşük bulunurken yıllara göre değişiklik göstermekle birlikte Haziran ayının başından Temmuz ayının ilk yarısına kadar afit popülasyonu yükselmeye devam etmiştir Temmuz ayının ikinci haftasından sonra ise popülasyonda tekrar bir düşme gözlenmiştir (Şekil 4.12). Çağlayan ve ark. (2013)'nın Ege Bölgesi-İzmir'de yaptıkları benzer bir çalışmada 2010 yılında afit popülasyonunun en yüksek olduğu tarih 26 Mayıs olarak saptanırken, 2011 yılında 31 Mayıs olarak bildirilmiştir. Kaya ve ark. (2014)'nın Hatay'da yaptıkları benzer bir çalışmada afit popülasyonunun Mayıs ayının son haftası en yüksek düzeye ulaştığını tespit etmişlerdir (30.05.2013). Bu bulgular bizim çalışmamızla elde edilen sonuçlar ile kıyaslandığında Kayseri ilinin iklim koşullarının belirtilen diğer illerden daha sert olması ve afitlerin popülasyon artışı için gerekli sıcaklık koşullarının Haziran (günlük ortalama en yüksek ve düşük sıcaklıklar sırasıyla 25,7°C, 14,2°C) ve Temmuz (günlük ortalama en yüksek ve düşük sıcaklıklar sırasıyla 26,8°C, 19,5°C) aylarında sağlanması nedeniyle farklılık göstermiştir.



Şekil 4.12. PPV ile enfekteli bahçenin yanında bulunan anaç deneme parselinde farklı anaç türlerinden yapışkan sürgün yöntemine göre 2015 ve 2016 yıllarında ilkbahar ve yaz aylarında her hafta toplanan farklı afit türlerinin ortalama sayısı.

Deneme parselinde PPV'nin kısa mesafede yayılmasında sorumlu olabilecek afit türleri olarak *Aphis gossypii*, *A. craccivora*, *A. spiraecola*, *Brachycaudus helichrysi*, *Hyalopterus pruni*, *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae* ve teşhisi yapılamayan diğer bazı türler saptanmıştır. Saptanan afit türlerinin yüzdelik değerleri irdelendiğinde 2015 yılında % 44.56 değeriyle en yüksek oran *A. spiraecola* olurken, bunu sırasıyla % 31.70 *H. pruni*, % 16.85 *M. persicae*, % 2.43 teşhisi yapılamayan diğer türler, % 2.21 *A. gossypii*, % 1.99 *B. helichrysi* ve % 0.22 ile *M. euphorbiae* izlemiştir. 2016 yılında ise % 39,36 değeriyle yine en yüksek oran *A. spiraecola* olurken, bunu sırasıyla % 36,71 *M. persicae*, % 20,16 *H. pruni*, % 1,80 *B. helichrysi*, % 0,83 ile *A. gossypii*, % 0,55 teşhisi yapılamayan diğer türler, % 0,44 *M. euphorbiae* ve % 0,13 ile *A. craccivora* izlemiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Deneysel anaç parselinden yapışkan sürgün metoduna göre her hafta toplanan farklı türlere ait afit sayısı ve oransal değerleri

Afit türleri	2015		2016	
	Birey Sayısı	%	Birey Sayısı	%
<i>Myzus persicae</i>	76	16.85	264	36.71
<i>Aphis gossypii</i>	10	2.21	6	0.83
<i>A. spiraecola</i>	201	44.56	283	39.36
<i>Hyalopterus pruni</i>	143	31.70	145	20.16
<i>Brachycaudus helichrysi</i>	9	1.99	13	1.80
<i>A. craccivora</i>	0	0	1	0.13
<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	1	0.22	3	0.41
Diğer türler	11	2.43	4	0.55
Toplam	451		719	

Dünya da bugüne değin yapılan çalışmalarda en yaygın saptanan PPV vektörleri *Brachycaudus cardui*, *B. helichrysi*, *M. persicae*, *Phorodon humuli* (Sullivan, 2011) ve *A. spiraecola*'dır (Cambra ve ark., 2004). Ülkemizde (Antakya/Hatay ve İzmir-Ege bölgesi) yapılan çalışmaların sonucuna göre *M. persicae*, *A. fabae*, *A. gossypii*, *A. spiraecola*, *H. pruni*, *Macrosiphon euphorbiae* ve *A. craccivora* en yaygın PPV vektörleri olarak tespit edilmiştir (Çağlayan ve ak., 2014; Kaya ve ark., 2014). İç Anadolu Bölgesi'nde (Kayseri) PPV'nin epidemiyolojisinden sorumlu vektörlerin belirlenmesi amacıyla yaptığımız çalışmanın sonucunda belirlenen afit türleri dünyada

ve Türkiye’de yapılmış çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermiştir. PPV’nin doğal olarak taşınması ilkbahar aylarında en hızlı iken yaz aylarında düşük orandadır. Bizim çalışmamızda bölgemizdeki iklim koşullarına bağlı olarak afit miktarı 16-23 Haziran tarihleri arasında en yüksek popülasyona ulaşmıştır.

#### 4.3.3.1. Afıt bünyesinde PPV’ün bulunma durumunun Real Time Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi ile Saptanması

Şarka hastalığı yaprak bitleriyle çok hızlı bir şekilde taşınabildiği için kontrolünde zorluklar yaşanmaktadır (Llacer ve ark., 1992). Hastalığın hangi afit ile ne kadar etkin taşındıklarının bilinmesi etmenin yayılmasının kontrol edilmesinde önemli olmaktadır.

Real Time RT-PCR analiz sonuçlarına göre 2015 ve 2016 yıllarında ilkbahar ve yaz döneminde (Mayıs-Ağustos ayları) *in vitro*’da üretilen 5 farklı anaçtan toplanan afit türleri, sayıları ve PPV enfeksiyon oranları Çizelge 4.4 ve 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. 2015 yılında *in vitro* üretilen farklı anaçlardan toplanan afit türleri, sayıları ve PPV enfeksiyon oranları (enfekteli afit/testlenen toplam afit sayısı)

Anaçlar (2015) (Enfekteli afit/testlenen toplam afit sayısı)						
Afit türleri	Nemaguard	Myrobolan 29 B	Myrobolan 29 C	GF 677	Garnem	Toplam
<i>Aphis gossypii</i>	0/0	1/1	2/2	0/0	7/7	10/10 (%100)
<i>A. spiraecola</i>	26/44	18/28	22/43	23/40	23/46	112/201 (%55.72)
<i>A. craccivora</i>	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Hyalopterus pruni</i>	18/92	8/12	3/13	12/21	3/5	44/143 (%30.76)
<i>Myzus persicae</i>	15/44	12/12	7/8	1/12	0/0	35/76 (%46.05)
<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0	0/1
<i>Brachycaudus helichrysi</i>	3/4	1/1	0/0	3/4	0/0	7/9 (%77.77)
Diğer türler	4/11	0/2	0/0	0/0	0/0	4/13 (%30.76)
Toplam	66/195 (%33.85)	40/56 (%71.42)	34/67 (%50.74)	39/77 (%50.64)	33/58 (%56.89)	212/453 (%46.79)

Çizelge 4.5. 2016 yılında *in vitro* üretilen farklı anaçlardan toplanan afit türleri, sayıları ve PPV enfeksiyon oranları (Enfekteli afit/testlenen toplam afit sayısı)

Anaçlar (2016) (Enfekteli afit/testlenen toplam afit sayısı)						
Afit türleri	Nemaguard	Myrobolan 29 B	Myrobolan 29 C	GF 677	Garnem	Toplam
<i>Aphis gossypii</i>	1/1	2/2	0/0	3/3	0/0	6/6 (%100)
<i>A. spiraecola</i>	64/70	21/31	34/61	43/57	54/64	216/283 (%76.32)
<i>A. craccivora</i>	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0	0/1
<i>Hyalopterus pruni</i>	50/74	3/5	21/34	12/16	4/16	90/145 (%62.06)
<i>Myzus persicae</i>	78/130	4/4	10/12	51/60	50/58	193/264 (%73.1)
<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	0/0	3/3	0/0	0/0	0/0	3/3 (%100)
<i>Brachycaudus helichrysi</i>	0/0	0/0	4/8	0/0	4/5	8/13 (%61.53)
Diğer türler	0/0	1/1	1/1	0/2	0/0	2/4 (%50)
Toplam	193/275 (%70.18)	34/46 (%73.91)	70/117 (%59.82)	109/138 (%78.98)	112/143 (%78.32)	518/719 (%72.04)

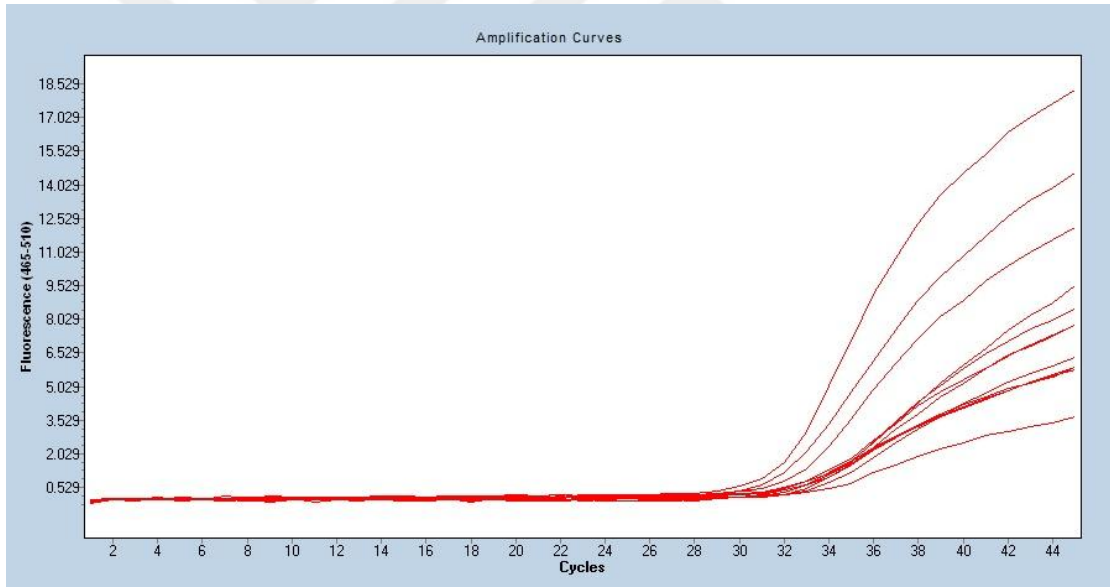
Birçok bitki virüsü gibi PPV'nin de bir bitkiden diğerine aktarılması için vektör böceklere ihtiyaç duyar. Bu aktarım ilk önce PPV ile bulaşık bir bitki ile vektörün beslenmesi ile başlar, afit bir ile birkaç saat virüsü stiletinde tutar ve latent döneme gerek duymadan beslenme hareketiyle yeni bitkilere virüsü aktarmasıyla sonuçlanır (Cambra ve Vidal, 2017). Epidemiyolojik çalışmalarda afit vektörün türü kadar fidanlıkları ziyaret eden afit türlerinin virüsü bünyelerine alma oranında önemlidir. Non-sirkülatif olarak yaprak bitleriyle taşınan PPV'nin vektör bünyesinde PCR tabanlı saptanmasına yönelik ülkemizde çok az çalışma bulunmaktadır. Real Time PCR afitlerin bünyesinde virüsün belirlenmesi için çok hasas bir yöntemdir. Bu yöntem non-sirkülatif taşınmanın söz konusu olduğu virüslerin afit bünyesindeki varlığını saptanmasında etkin kullanılan bir yöntemdir (Fabre ve ark., 2003). 2015 yılında testlenen 453 afitten 212 adedi PPV vektörü olarak belirlenirken; 2016 yılında 719 afitten 518'i PPV vektörü olarak belirlenmiştir. 2015 yılı ile 2016 yılı verileri karşılaştırıldığında enfekteli afit sayısının iki katına çıktığı belirlenmiştir. Yapılan testlemelere göre; 2015 yılında 5 farklı anaçtan toplanan ve test edilen 76 *M. persicae* türünden 35'i, 10 *A. gossypii* türünden 10'u, 201 *A. spiraecola* türünden 112'si, 143. *H. pruni* türünden 44'ü, 9 *B. heliochrysi* türünden 7'si, ve 13 adet diğerlerinden 4'ü; 2016 yılında test edilen 264 *M. persicae* türünden 193'ü, 6 *A. gossypii* türünden 6'sı, 283 *A.*



*spiraecola* türünden 216'sı, 145 *H. pruni* türünden 90'ı, 13 *B. heliochrysi* türünden 8'i, 3 *M. euphorbiae* türünden 3'ü ve 4 adet diğerlerinden 2'si bünyesinde PPV içermektedir. Real Time RT-PCR analiz sonuçlarına göre 2015 ve 2016 yıllarında Kayseri ilinde PPV'nin taşınmasında en etkin afit türleri olarak *A. spiraecola*, *M. persicae* ve *H. pruni* bulunmuştur (Şekil 4.13, 4.14, 4.15; Çizelge 4.6, 4.7, 4.8). Dünya genelinde ve Türkiye'de yapılan çalışmalarda PPV'nin epidemiyolojisinden sorumlu ana afit türleri olarak *Myzus persicae*, *Hyalopterus pruni* ve *A. spiraecola* belirtilmiştir (Cambra ve ark., 2006; Gildow ve ark., 2004; Labonne ve Dallot, 2006; Çağlayan ve ark., 2013; Kaya ve ark., 2014). PPV'nin afitle taşınması birçok faktöre bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Bu faktörlerden en önemlileri PPV ırkları ve bölgenin iklim özellikleridir. Bunlara bağlı olarak çalışmanın yapıldığı bölgelerde toplanan PPV vektörü afit türlerinde farklılıklar ortaya çıkabilmektedir. Bizim çalışmamızda belirlenen vektör afitler Türkiye'de ve dünyada iklimsel özellikleri birbirine yakın bölgelerde yapılan çalışmalarla benzer sonuçlar göstermiştir Bunun yanı sıra Çizelge 4.4'te görüldüğü gibi Kayseri ilinde PPV'nin taşınmasında en etkin rol oynayan olası vektörlerden *A. spiraecola*, *Hyalopterus pruni* ve *Myzus persicae* türleri Garnem ve GF677 çeşitlerini de yoğun olarak ziyaret etmesine ve PPV enfekteli afit oranının oldukça yüksek olmasına karşın bu iki anaç çeşidinde üç yıl boyunca PPV enfeksiyonu saptanamaması bu çeşitlerin PPV'ye tolerant olduğunu göstermiştir. Ülkemizde Doğu Akdeniz (Hatay) ve Ege Bölgesi'nde (İzmir-Menemen) yürütülen benzer bir çalışmada da aynı paralellikte sonuç alınmıştır. Real time PCR analiz sonucuna göre *M. persicae* örnekleri 31.65 CP ve 33.62 CP aralığında, *A. spiraecola* 31.84 CP ve 34.12 CP aralığında ve 32.82 CP ve 36.42 CP aralığında pozitif sonuç vermiştir (CP: Crossing point (DNA çoğalmasının görünebilir olduğu ilk nokta)).

Çizelge 4.6. Real-time RT-PCR ile PPV tespit edilen *Myzus persicae* örneklerinin bir kısmının cihaz verilerine göre analiz sonuç raporu.

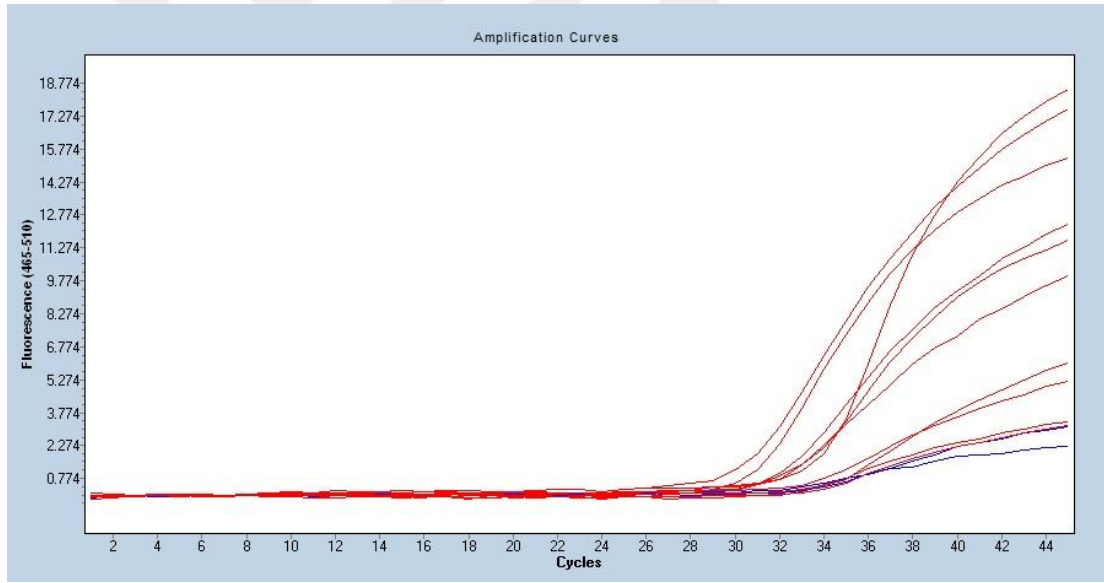
Experiment: plate 5 Selected Filter: FAM (465-510)				
Include	Color	Pos	Name	Cp
True	255	D1	<i>M. persicae</i>	31.95
True	255	D2	<i>M. persicae</i>	32.30
True	255	D3	<i>M. persicae</i>	33.44
True	255	D4	<i>M. persicae</i>	33.62
True	255	D5	<i>M. persicae</i>	32.95
True	255	D6	<i>M. persicae</i>	33.28
True	255	D7	<i>M. persicae</i>	31.61
True	255	D8	<i>M. persicae</i>	33.32
True	255	D9	<i>M. persicae</i>	33.47
True	255	D10	<i>M. persicae</i>	31.80
True	255	D11	<i>M. persicae</i>	32.07
True	255	D12	<i>M. persicae</i>	32.44



Şekil 4.13. Real-time RT-PCR ile PPV tespit edilen *Myzus persicae* örneklerinin bir kısmının DNA amplifikasyon eğrisi.

Çizelge 4.7. Real-time RT-PCR ile PPV tespit edilen *A. spiraecola* örneklerinin bir kısmının cihaz verilerine göre analiz sonuç raporu.

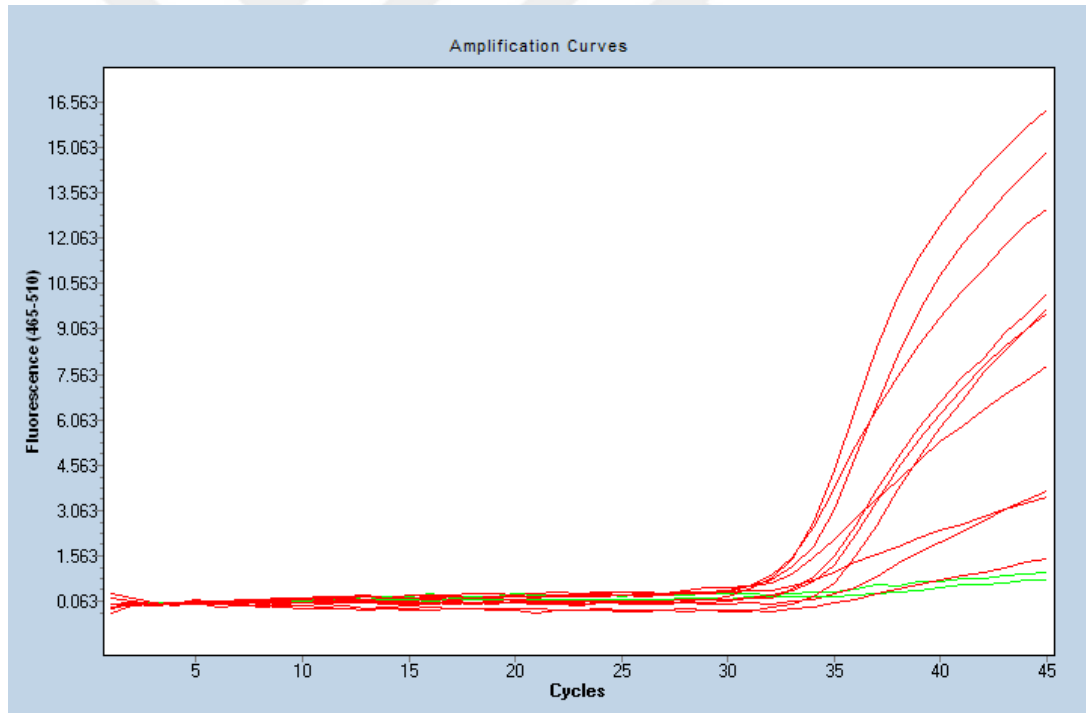
Experiment: plate 5 Selected Filter: FAM (465-510)				
Include	Color	Pos	Name	Cp
True	255	E1	<i>A. spiraecola</i>	32.35
True	255	E2	<i>A. spiraecola</i>	31.84
True	255	E3	<i>A. spiraecola</i>	33.20
True	255	E4	<i>A. spiraecola</i>	33.30
True	255	E5	<i>A. spiraecola</i>	31.87
True	255	E6	<i>A. spiraecola</i>	30.49
True	255	E7	<i>A. spiraecola</i>	32.03
True	255	E8	<i>A. spiraecola</i>	32.64
True	255	E9	<i>A. spiraecola</i>	33.58
True	255	E10	<i>A. spiraecola</i>	34.12
True	255	E11	<i>A. spiraecola</i>	30.64
True	255	E12	<i>A. spiraecola</i>	33.22



Şekil 4.14. Real-time RT-PCR ile PPV tespit edilen *A. spiraecola* örneklerinin bir kısmının DNA amplifikasyon eğrisi.

Çizelge 4.8. Real-time RT-PCR ile PPV tespit edilen *H. pruni* örneklerinin bir kısmının cihaz verilerine göre analiz sonuç raporu

Experiment: plate 5 Selected Filter: FAM (465-510)				
Include	Color	Pos	Name	Cp
True	255	H1	<i>H. pruni</i>	34.94
True	255	H2	<i>H. pruni</i>	34.2
True	255	H3	<i>H. pruni</i>	35.31
True	255	H4	<i>H. pruni</i>	34.83
True	255	H5	<i>H. pruni</i>	34.92
True	255	H6	<i>H. pruni</i>	34.79
True	255	H7	<i>H. pruni</i>	34.59
True	255	H8	<i>H. pruni</i>	32.82
True	255	H9	<i>H. pruni</i>	34.83
True	255	H10	<i>H. pruni</i>	33.33
True	255	H11	Su kontrol	0
True	255	H12	Negatif	0



Şekil 4. 15. Real-time RT-PCR ile PPV tespit edilen *H. pruni* örneklerinin bir kısmının DNA amplifikasyon eğrisi.

#### 4. SONUÇ ve ÖNERİLER

Meyve yetiştiriciliğinde erik, şeftali, nektarin, kiraz, vişne ve kayısının içinde bulunduğu sert çekirdekli, diğer bir deyişle taş çekirdekli meyveler dünyada önemli bir ürün grubunu oluşturmaktadır. Plum pox virüs (PPV)'ün neden olduğu Şarka hastalığı dünyada sert çekirdekli meyve yetiştiriciliği yapılan tüm ülkelerde en fazla zarar yapan hastalıklardan biridir. Şarka hastalığı hem iç hem dış karantiyaya tabii bir hastalıktır. Bu çalışma ile elde edilen bulgular “PPV ile inokule edilen test bitkilerinde virüs hareketinin kantitatif olarak belirlenmesi ve Kayseri ilinde PPV-T ırkının epidemiyolojisinin Araştırılması” olmak üzere iki ana başlık altında yapılan çalışmaları içermektedir.

Birinci çalışma paketinde ülkemize ait bir ırk olan PPV-T (Turkey) tütün (*Nicotiana benthamiana*) bitkilerine mekanik inokulasyon yöntemiyle inokule edilmiştir. *N. benthamiana* bitkilerinde PPV'nin kantitatif analizi için Real-Time PCR optimizasyonu yapılmış ve PPV-T ırkının bu bitkide hangi hızda yayıldığı ve yayılma sürecinde oluşturduğu belirtilen semptomlar gözlenmiştir. 10 tekerrürlü olarak kurulan denemede, inokulasyon yapılan yapraktan ilk günden itibaren her gün 7-8 mm boyutunda alınan disk şeklindeki örneklerin kantitatif analizi ile PPV'nin bitki içindeki yayılma hızı izlenmiş ve 2 ila 4 gün içerisinde altan 3-5. yaprağa ulaştıkları tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada test bitkilerinde PPV hareketinin kantitatif verilerle belirlenmesine yönelik ülkemizde yapılan ilk çalışmadır. PPV-T ile inokule edilen tütün bitkilerinde virüsün oldukça hızlı yayıldığı; yaprak damar aralarında renk açılmaları ve kabartılar gibi belirtilen semptomlar oluşturduğu gözlenmiştir. Bu ön bulgular ülkemize özel bir ırk olan PPV-T'nin diğer PPV ırkları gibi oldukça virulent olduğunu göstermekte ve kontrol stratejilerinin geliştirilmesinde bu durumun dikkate alınması gerektiğini ortaya koymaktadır.

İkinci çalışma paketinde ise PPV'nin epidemiyolojisi çalışmalarında Kayseri ilinde doğal enfekteli kayısı, erik ve şeftalinin karışık dikim yapıldığı bir bahçe seçilerek öncelikle bu bahçedeki PPV enfeksiyon oranı ve ırkı saptanmıştır. Deneme parseline uzaklığı 2 m ile 100 m arasında olan bölgelerden tesadüfi olarak toplanan 18 adet *Prunus* örneğinden 6 tanesi PPV ile enfekteli bulunmuş ve etmen PPV-T olarak tanımlanmıştır. Bu ırkın doğal taşınma durumunu ortaya koymak amacıyla seçilen bu bahçenin kenarına PPV'ye duyarlı olduğu bilinen Myrobolan 29 B ve C, Nemaguard ile

kısmi olarak tolerant olan Garnem ve GF677 anaçları dikilmiş ve anaç dikimini izleyen yılın ilkbahar aylarında simptom gösterip göstermemesine bakılmaksızın anaçların tamamından yaprak örnekleri alınarak DAS ELISA ve RT-PCR yöntemleriyle testlenmiştir. Denemenin ilk kurulduğu yıl olan 2015 yılında yapılan testlemeler sonucunda pozitif anaç belirlenemezken; 2016 ve 2017 yıllarında yapılan analizler sonucunda Myrobolan 29B, Myrobolan 29 C ve Nemaguard anaçları PPV ile enfekteli bulunmuştur. Bu bulgular çerçevesinde sert çekirdekli fidan üretiminde özellikle PPV tespit edilen alanlarda Myrobolan 29B, C ve Nemaguard anaçlarının kullanılmaması ve GF677 ve Garnem'in tercih edilmesi önerilmektedir.

Kayseri ilinde PPV'nin olası vektörlerinin belirlenmesi amacı ile iki yıl boyunca yapılan çalışmalarda en yüksek afit popülasyonu Haziran ayında tespit edilmiştir. Deneme parselinde PPV'nin kısa mesafede yayılmasında sorumlu olabilecek afit türleri olarak *Aphis gossypii*, *A. craccivora*, *A. spiraecola*, *Brachycaudus helichrysi*, *Hyalopterus pruni*, *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae* saptanmıştır. Bu afit türlerinin yıllara göre yoğunluğu incelendiğinde 2015 yılında % 44.56 değeriyle en yüksek oran *A. spiraecola* olurken, bunu sırasıyla % 31.70 *H. pruni*, % 16.85 *M. persicae*, % 2.43 teşhisi yapılamayan diğer türler, % 2.21 *A. gossypii*, % 1.99 *B. helichrysi* ve % 0.22 ile *M. euphorbiae* izlemiştir. 2016 yılında ise % 39.36 değeriyle yine en yüksek oran *A. spiraecola* olurken, bunu sırasıyla % 36.71 *M. persicae*, % 20.16 *H. pruni*, % 1.80 *B. helichrysi*, % 0.83 ile *A. gossypii*, % 0.55 teşhisi yapılamayan diğer türler, % 0.44 *M. euphorbiae* ve % 0.13 ile *A. craccivora* izlemiştir. Afıt yoğunluğu ve bu afitlerde PPV'nin saptanma oranı birlikte değerlendirildiğinde ise Kayseri ilinde PPV'nin taşınmasında etkin rol oynayabilecek afit türlerinin *A. spiraecola*, *M. persicae* ve *H. pruni* olduğu kanısına varılmıştır.

Virüslerin etkin bir kimyasal mücadelesi bulunmadığından korunma önlemleri ön plana çıkmaktadır. PPV gibi non-persistent taşınan virüslerin vektörleriyle mücadelesinde virüsün böcek bünyesine alınması ve aktarması arasında çok kısa bir süre bulunması nedeniyle de pestisit kullanımı önerilmemektedir. PPV'nün afitler ile taşınma durumu Ege ve Akdeniz bölgelerinde sırasıyla İzmir ve Hatay'da önceki çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışma ile de sert çekirdekli meyve ağaçlarının yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Kayseri ilinde PPV epidemiyolojisinde rol oynayan afit türleri belirlenmiş ve bu sonuçlar doğrultusunda doğal enfeksiyon

koşullarında PPV-T ırkına tolerant anaç türlerinin belirlenerek fidan üreticilerine önerilmesi ile PPV'ye karşı kontrol stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlanması konusunda önemli veriler elde edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları literatür bilgileri ile desteklendiğinde aşağıdaki somut öneriler ön plana çıkmaktadır:

1- PPV'ye tolerant olarak tespit edilen GF677 ve Garnem gibi anaçların tercih edilmesi,

2- Yeni tesis edilecek bahçelerde Sertifikalı ve PPV'den arı fidanların tercih edilmesi

3-Fidanların bahçeye dikildikten sonra da belirli aralıklarla PPV açısından düzenli olarak testlenmesi,

4-Afitlerle PPV'nin taşınma olasılığını azaltmaya yönelik mücadele yöntemlerinin uygulanması.

## KAYNAKLAR

- Agrios, G. 2005. Plant pathology. **Elsevier Academic Press**. 767p.
- Ağaoğlu, Y.S., Çelik, H., Çelik, M., Fidan, Y., Gülşen, Y., Günay, A., Halloran, N., Köksal, A.İ., ve Yanmaz, R., 1997. **Genel Bahçe Bitkileri**. T.C. A.Ü.Z.F. **Eğitim, Araştırma ve Geliştirme Vakfı Yayınları** No: 4, Ankara.
- 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, 2006. Real-Time PCR applications guide. **BIORAD**. [http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_5279.pdf](http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf)
- Anonim, 2008. **Zirai Mücadele Teknik Talimatları**. 4: 87p.
- Atanasoff, D., 1932. Plum pox. A new virus disease. In *Yearbook university of sofia*, University of Sofia, **F.o.A. Ed. Sofia**, (11): 49–69.
- Avinent L., Hermoso de Mendoza A., Llacer G., 1993. Comparison of sampling methods to evaluate aphid populations (Homoptera, Aphidinea) alighting on apricot trees. **Agronomie**. 13: 609-613.
- Avogadro, A., 1811. Essai d'une manière de déterminer les masses relatives des molécules élémentaires des corps, et les proportions s'elon lesquelles elles entrent dans ces combinaisons. **J. Phys.** 73, 58.
- Bertolini, E., Olmos, A., Martínez, M.C., Gorris, M.T., Cambra, M., 2001. Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colorimetric detection of six RNA viruses in olive trees. **J. Virol. Methods** 96, 33–41.
- Blazek, J., Paprstein, F., R. Karesova., 2003. Spread of Plum pox virus in new plum orchards of the Czech Republic and resistant cultivars to the disease. **Acta Hort.** 622, 359—364.
- Cambra, M., Asensio, M., Gorris, M.T., P'erez, E., Camarasa, E., Garc'ia, J.A., Moya, J.J., L'opez-Abella, D., Vela, C., Sanz, A., 1994. Detection of *Plum pox potyvirus* using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. **EPPO Bull.** 24, 569–577.
- Cambra, M., Capote, N., Cambra, M.A., Llacer, G., Botella, P. & Lopez-Quilez, A. 2006. Epidemiology of sharka disease in Spain. **OEPP/EPPO Bulletin** 36: 271-275.
- Cambra, M., Gorris, M.T., Capote, N., Asensio, M., Martínez, M.C., Bertolini, E., Collado, C., Hermoso de Mendoza, A., Mataix, E., 2004. Epidemiology of *Plum pox virus* in Japanese Plums in Spain. **Acta Horticult.** 657, 195–200.
- Cambre, M., and Vidal, E., 2017. Sharka, a vector-borne disease caused by Plum pox virus: vector species, transmission mechanism, epidemiology and mitigation strategies to reduce its natural spread. **ISHS Acta Horticulturae** 1163: III International Symposium on Plum Pox Virus. Doi: 10.17660/ActaHortic.2017.1163.10.
- Candresse, T., Macquaire, G., Lanneau, M., Bousalem, M., Quiot-Douine, L., Quiot, J.B., Dunez, J., 1995. Analysis of *Plum pox virus* variability and development of strain-specific PCR assays. **Acta Horticult.** 386, 357–369.
- Candresse, T.; Svanella–Dumas, L.; Gentit, P.; Caglayan, K.; Cevik, B. 2007, First report of the presence of plum pox virus rec strain in turkey. **Plant Dis.** 91, 331–331.



- Capote, N., Perez-Panades, J., Monzo, C., Carbonell, E.A., Urbaneja, A., Scorza, R., Ravelonandro, M., Cambra, M., 2008. Assessment of the diversity and dynamics of Plum pox virüs and aphid populations in transgenic European plums under Mediterranean conditions. **Transgenic Research**, 17: 367-377.
- Ceylan, A., Gürcan, K., Akbulut, M., Ghaderi, M., 2013b. Kayseri’de Yüksek Şarka Enfeksiyonu. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 30(2): 80-85.
- Ceylan, A., Gürcan, K., Ghaderi, M., Akbulut, M., Serçe Ulubaş, Ç., 2013a. Transmission route of new Plum pox virüs introductions in Turkey. Book of abstracts. 2<sup>nd</sup> International Symposium on Plum pox virüs. **Olomouc, Czech Republic**, September 3-6, p19.
- Chirkov, S., Sheveleva, A., Ivanov, P., Zakubanskiy, A., 2018. Analysis of Genetic Diversity of Russian Sour Cherry Plum pox virus Isolates. Provides Evidence of a New Strain. **Plant Disease**, 102:569-575 <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-17-1104-RE>.
- Clark, M. F. and Adams, A. N., 1977. Characteristics of the Micro-Plate Method of Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. **Journal Of General Virology**. 34, 475-483.
- Crescenzi, A., d’Aquino, L., Comes, S., Nuzzaci, M., Piazzolla, P., Boscia, D., Hadidi, A., 1997. Characterization of the sweet cherry isolate of Plum pox potyvirus. **Plant Disease**, **81**: 711–714.
- Çağlayan, K., Serçe, C.U., Gazel, M., Kaya, K., Cengiz, F.C., Vidal, E., 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., Quiot-Douine, L., Sáenz, P., Cervera, M. T., García, J.-A., and Quiot, J.-B. 2001. Identification of Plum pox virus determinants implicated in specific interactions with different *Prunus* spp. **Phytopathology** 91:159-164.
- 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 Hort.*, 550: 145–152.
- Desvignes, J.C., Boyé, R., Cornaggia, D., Grasseau, N., 1999 Virus diseases of fruit trees. **Ctifl, Paris** (FR).
- Dicenta, F., Martí’nez-Go’mez, P., Rubio, M., Audergon, J.M., 2003. Localisation and movement of Plum pox virus in apricot stem tissues. **Ann. Appl. Biol.** 142, 99– 105.
- Dragoiski, K., H. Dinkoya, and I. Miney, 2002: Rate of PPV infection of some plum cultivars depending on rootstock and management systems. **Acta Hort.** 577, 263—267
- Elibuyuk, I.O. 2004. Current situation of sharka disease in ankara, Turkey. **Phytoparasitica**, 32, 417–420.
- EPPO, 2019. EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests. <https://gd.eppo.int/taxon/PPV000/distribution> (Erişim tarihi: 22.05.2019).

- Fabre, F., Kervarrec, C., Mieuzet, L., Riault, G., Vialatte, A., Jacquot, E., 2003. Improvement of Barley yellow dwarf virus-PAV detection in single aphids using a fluorescent real-time RT-PCR. **J. Virol. Methods** 110, 51–60.
- Fanigliulo, A., Comes, S., Maiss, E., Piazzolla, P., 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. **Archives of Virology**, **148**: 2137–2153.
- García, J. A., Glasa, M., Cambra, M., Candresse, T., 2014. Plum pox virus and sharka: a model potyvirus and a major disease. **Molecular Plant Pathology**. 15: 226-41.
- Gazel, M.; Serce, C.U., Kaya, K., Cengiz, F.C., Cambra, M., Çağlayan, K. 2014. Farklı Prunus Anaçlarının Plum pox virüs-T'nün Doğal Enfeksiyonuna Olan Duyarlılıkları. **Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi**, 3-5 Şubat 2014, Antalya. P: 180.
- Gildow, F., Damsteegt, V., Stone, A., Schneider, W., Luster, D., Levy, L., 2004. Plum pox in North America: identification of aphid vectors and a potential role for fruit in virus spread. *Phytopathology*, 94: 868–874.
- Glasa, M., Malinowski, T., Predajna, L., Pupola, N., Dekena, D., Michalczyk, L., Candresse, T., 2011. Sequence variability, recombination analysis, and specific detection of the w strain of *Plum pox virus*. **Phytopathology**, 101: 980–985.
- Glasa, 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. **Journal of General Virology**, 85: 2671-81.
- Glasa, M., Prikhodko, Y., Predajna, L., Nagyova, A., Shneyder, Y., Zhivaeva, T., Subr, 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, 972–979.
- Gottwald, T.R., Avinent, L., Llácer, G., Hermoso De Mendoza, A. & Cambra, M. (1995) Analysis of the spatial spread of sharka (Plum pox virus) in apricot and peach orchards in Eastern Spain. **Plant Disease** 79: 266–278.
- Gül, M., Akpınar, M.G., 2006. Dünya ve Türkiye Meyve Üretimindeki Gelişmelerin İncelenmesi. **Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 19(1), 15-27.
- 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. 2016. Strain identification and sequence variability of Plum pox virus in Turkey. **Turkish Journal of Agriculture And Forestry**, 40: 1-16.
- Gürcan, K., Ceylan, A., Akbulut, M., Comart, S., Akbaş, B., Ghaderi, M. (2013b). Plum pox virüs D in Turkey. Book of abstracts. 2<sup>nd</sup> International Symposium on Plum pox virüs. **Olomouc, Czech Republic, September 3-6**, p22.
- Gürcan, K., Ceylan, A., Akbulut, M., Değirmenci, K., 2013a. PPV-T is common at home gardens of Central Anatolia. Book of abstracts. 2<sup>nd</sup> International Symposium on Plum pox virüs. **Olomouc, Czech Republic, September 3-6**, p21.
- Isac, M., Preda, M., Marcu, M., 1998. Aphid species-vectors of Plum pox virus, **Acta Virologica**, 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.

- James, D., Varga, A., Sanderson, D., 2013. Genetic diversity of Plum pox virus: strains, disease and related challenges for control. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 35: 431–441.
- 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, M., Fuchs, E., Grüntzig, M., Krezal, G., Wegener, B., 1996. Susceptibility of genotypes of the genus *Prunus* to Plum pox virus. **Plant Dis. Prot.** 103, 225–261.
- Kerlan, C. and Dunez, J. (1979) Différenciation biologique et sérologique des souches du virus de la sharka. **Ann. Phytopathol.** 11, 241–250.
- Kimura, K., Usugi, T., Hoshi, H., Kato, A., Ono, T., Koyano, S., Kagiwada, S., Nishio, T., and Tsuda, S. 2016. Surveys of viruliferous alate aphid of *Plum pox virus* in *Prunus mume* orchards in Japan. **Plant Dis.** 100:40–48.
- Kurçman, S., 1973. Nachweis des sharka-virus an aprikosen und pflaumenbaumen in Ankara. **The Journal Turkish Phytopathology.** 2(3): 124–129.
- Labonne, G. and Dallot, S., 2006. Epidemiology of sharka disease in France. **EPPO Bull.**, 36, 268–270.
- Llacer, G., Avinent, L., and Hermoso de Mendoza, A., 1992. Epidemiology of plum pox (sharka) virus in Valencia (Spain). **Acta Hort.** 309, 129–134.
- Lowery, D. T., Vickers, P., Bittner, L.A., Stobbs, L. W., Footitt, R.G., 2015. Aphid Transmission of the Ontario Isolate of Plum Pox Virus. **J. Econ. Entomol.** 108(5): 2168–2173 (2015); DOI: 10.1093/jee/tov172
- Maejima, K., Himeno, M., Komatsu, K., Takinami, Y., Hashimoto, M., Takahashi, S., Yamaji, Y. Oshima, K., Namba, S., 2011. Molecular epidemiology of *Plum pox virus* in Japan. **Phytopathology**, 101: 567–574.
- Matic, S., Al-Rwahnih, M., Myrta, A., 2006. Diversity of Plum pox virus isolates in Bosnia and Herzegovina. **Plant Pathology**, 55: 11–17.
- Mavrodieva, V., James, D., Williams, K., Negi, S., Varga, A., Mock, R., 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.
- Nemchinov, L. and Hadidi, A., 1996. Characterization of the sour cherry strain of Plum pox virus. **Phytopathology**, 86: 575–580.
- 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 single aphids. **Journal of Virological Methods** 128: 151–155.
- Olmos, A., Cambra, M., Das'1, M.A., Candresse, T., Esteban, O., Gorris, M.T., Asensio, M., 1997. Simultaneous detection and typing of Plum pox potyvirus (PPV) isolates by heminested-PCR and PCR-ELISA. **J. Virol. Methods** 68, 127–137.
- Olmos, A., Esteban, O., Bertolini, E., Cambra, M., 2003. Nested-PCR in a single closed tube (pp. 151–159). In: Bartlett, J., Stirling, D. (Eds.), *Methods in Molecular*

- Biology. PCR Protocols: Methods and Applications, vol. 226, 2a ed. **Humana Press**, Totowa, p. 545.
- Osman F., Rowhani A., 2006. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). **Journal of Virological Methods** 133: 130-136.
- Palmisano, F., Boscia, D., Minafra, A., Myrta, A., Candresse, T., 2012. An atypical Albanian isolate of Plum pox virus could be the progenitor of the Marcus strain. 22nd International Conference on Virus and Other Graft Transmissible Diseases of **Fruit Crops** p. 33.
- Rasmussen, R., 2001. Quantification on the LightCycler instrument (pp.21–34). In: Meuer, S., Wittwer, C., Nakagawara, K. (Eds.), **Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications**. Springer, Heidelberg, p. 408.
- Rubio, M., Martínez-Gómez, P., Dicenta, F., 2008. Study of long-distance movement of Plum pox virus (Sharka) as an alternative resistance-evaluation method in *Prunus*. **Sci. Hortic.**, doi:10.1016/j.scienta.2008.06.010.
- Rubio, M., Martinez-Gomez, P., Pinochet, J. Dicenta, F., 2005. Evaluation of resistance to sharka (Plum pox virus) of several *Prunus* rootstocks. **Plant Breeding**, 124, 67-70.
- Sahtiyancı, S., 1968. Virus de la sharka chez le prunier. Bulletin Phytosanitaire FAO., 17 (3).
- Sertkaya, G., Serçe, Ç.U., Çağlayan, K., 2003. Detection and Characterization of Plum Pox Potyvirus (PPV) by DASI-ELISA and RT-PCR / RFLP Analysis in Turkey. **Turk J Agric For** 27: 213-220.
- Sochor, J., Babula, P., Adam, V., Krska, B. and Kizek, R. 2012. Sharka: The Past, The Present and The Future. **Viruses** (4): 2853-2901.
- Sullivan M., 2011. CPHST Pest Datasheet for Plum pox virus. **Journal of Plant Pathology** (2013), 95 (3), 579-586.
- Sutic, D.D., Ford, R.E., and Tosic, M.T., 1999. Handbook of plant virus diseases. **CRC Press**. London, NewYork, Washington.
- Topkaya, Ş., Ertunç, F., 2017. Bitki Patojeni Virüslerde Örtü Proteininin Yapısı ve Fonksiyonları. **Gaziosmanpaşa Journal of Scientific Research** 2017, 6(3), 116-126.
- TÜİK, 2017. Yıllara göre Türkiye’de sert çekirdekli meyve üretimi. [http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1001](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001) (Erişim tarihi 30.03.2018).
- Ulubaş Serçe Ç., Gazel, M., Çağlayan K., 2011. Plum pox virus streynlerinin Türkiye’deki Dağılımı (Distribution of Plum pox virus strains in Turkey), **Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri**, Kahramanmaraş s. 72.
- Ulubaş Serçe, Ç., Candresse, T., Svanella-Dumas, L., Krizbai, L., Gazel, M., Çağlayan, K., 2009. further characterization of a new recombinant group of Plum pox virus isolates, PPV-T, found in orchards in the Ankara province of Turkey. **Virus Research**, 142: 121-126.
- Varga A., ve James D., 2005. Detection and differentiation of Plum pox virus using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: a rapid method for strain typing. **Journal of Virological Methods** 123: 213–220.
- Varga A., ve James D., 2006. Real-time RT-PCR and SYBR Green I melting curve analysis for the identification of Plum pox virus strains C, EA, and W: Effect of amplicon size, melt rate, and dye translocation. **Journal of Virological Methods** 132:146–153.

- Varveri, C., 2006. Epidemiology of Plum pox virus strain M in Greece. **Bulletin OEPP/EPP** Bulletin 36: 276-278.
- Vidal E., Moreno A., Bertolini E., Perez-Panades J., Carbonell E.A., Cambra M., 2010. Susceptibility of Prunus rootstocks to natural infection of Plum pox virus and effect of mineral oil treatments. **Annals of Applied Biology** 157: 447-457.
- Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M., Dunez, J., 1991. A polymerase chain reaction assay adapted to Plum pox virus detection. **J. Virol. Methods** 33, 355–365.
- Youssef, S.A., Shalaby, A., 2006. Plum pox virus (PPV) in Egypt. **EPP** Bull., 36: 208s.



## ÖZGEÇMİŞ

Yazar, 1986 yılında Kayseri’de doğdu. İlkokul, Ortaokul ve Lise öğrenimini Kayseride ’de tamamladı. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü’nden 2009 yılında mezun oldu. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalından 2012 yılında Yüksek Lisans derecesiyle mezun oldu. 2011 yılında göreve başladığı Erciyes Üniversitesi Seyrani Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü’nde halen Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.

### Eserler

#### Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

- Temur C., Tiryaki O., (2013). Irradiation alone or comined with other alternative treatments to control postharvest diseases. African Journal of Agricultural Research, 8(5), 421-434. (Yayın No: 882591)
- Temur C., Tiryaki O., Başaran M., Uzun O., (2012). Adaptation and validation of QuEChERS method for the analysis of trifluralin in wind eroded soil. Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes, 47(9), 842-850. (Yayın No: 882586)
- Temur C., Tiryaki O. (2010). The Fate of Pesticide in the Environment. Journal of Biological and Environmental Sciences, 4(10), 29-38. (Yayın No: 882589)

#### B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler:

- Temur Çınar, C., Gazel, M., Gürcan, K., Çağlayan, K., 2018. Determination of the reaction to Plum Pox Virus-Turkey (PPV-t) infection of different prunus rootstocks in open field in Kayseri province. Türkiye VII. Bitki Koruma Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Muğla, Türkiye, 14-17 Kasım 2018, ss. 86.
- Temur C., Işık D., (2018). Determination of plant protection problems in sugar beet garden inkayseri province of Turkey. Çukurova I. Uluslararası Multidisipliner Çalışmalar Kongresi, 152-157. (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:4630710)
- Işık D., Fatma T., Temur C., (2018). Investigation of Potential Use of Some Corn Lines and Cultivars as a Trap Plant Against Broomrape (Orabanche Spp.). Çukurova I. Uluslararası Multidisipliner Çalışmalar Kongresi, 430-434. (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:4631553)
- Işık D., Temur C., (2018). Allelopathic Potential of Some Essential Oil Bearing Plant Extracts on Setaria spp. Çukurova I. Uluslararası Multidisipliner Çalışmalar Kongresi, 435-443. (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:4631211)

- Temur C., Işık D., (2018). Bazı Yabancı ot Türlerinin Plum Pox Virus'e Konukçuluk Etme Potansiyeli. Çukurova I. Uluslararası Multidisipliner Çalışmalar Kongresi, 159-163. (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:4630947)
- Temur C., Işık D., (2018). Determination of plant protection problems in Peache garden in Mersin province of Turkey. 2nd International Symposium on Innovative Approaches in Scientific Studies, 741-743. (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:4632582)
- Işık D., Temur C., (2018). Allelopathic Potential of Some Essential Oil Bearing Plant Extracts on *Chenopodium album* L. 2nd International Symposium on Innovative Approaches in Scientific Studies, 443-447. (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:4631824)
- Işık D., Temur C., Çolak E.Ş., Yüksel E., (2018). Organik Tarımda Zararlı Hastalık ve Yabancı Otlarla Mücadelede Uçucu Yağların Etkisi. International' EURASIAN Natural Nutrition and Healthy Life Congress, 245-248. (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:4633345)
- Işık D., Çolak E.Ş., Temur C., Bingöl S., (2018). Erzincan'da Gıda ve Tıbbi Olarak Kullanılan Yabancı Otlar. International. EURASIAN Natural Nutrition and Healthy Life Congress, 100-104. (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:4633616)
- Işık D., Temur C., Çolak E.Ş., Taşkesen Y.E., (2018). Develi'de Gıda ve Tıbbi Olarak Kullanılan Yabancı Otlar. International' EURASIAN Natural Nutrition and Healthy Life Congress, 84-87. (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:4633860)
- Yüksel E., Temur Çınar C., Işık D., Canhilal R., (2017). Microbial Pesticides in İpm. 3rd International Conference on Environmental Science And Technology, 10-10. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:3769029)
- Temur Çınar C., Yüksel E., Mert M., Işık D., Canhilal R., (2017). Determination of plant protection problems in potato field in Kayseri province of Turkey. 3rd International Agriculture Congress, 90-90. (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:3918988)
- Temur Çınar C., Yetük G., Bulut H., Yüksel E., Beyzi E., Işık D., Arslan M., (2017). Allelopathic effects of medical plants essential oils on *Parapholis incurva*. 3rd IAC and 3rd ICVAS CONGRESS, 32-32. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:3918147)
- Temur Çınar C., Yetük G., Bulut H., Yüksel E., Beyzi E., Işık D., (2017). Investigation on the Herbicidal Effects of Essential Oil Obtained From Two Mint Species on *Parapholis Incurva*. International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies, 522-522. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:3918627)

- Yüksel E., Temur Çınar C., Canhilal R., (2017). Entomopathogenic Nemetodes as Bio-control Agents in Agriculture. International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies, 314-314. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:3917116)
- Temur Çınar C., Yüksel E., Işık D., Canhilal R., (2017). New Approach to Plant Protection. International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies, 489-489. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:3917292)
- Yüksel E., Temur C., Canhilal R., Işık D. (2017). The Role of Biopesticides in Crop Protection. International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences
- Çağlayan K., Gazel M., Elçi E., Temur Çınar C., 2014. First report on Grapevine leafroll associated virus 1 infecting pomegranate trees (*Punica granatum* L.) in Turkey 14th Mediterranean Phytopathological Union (MPU) Congress, İstanbul, Türkiye, 25-29 August 2014, cilt.54, no.1, ss.175. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:3918322)
- Temur C., Tiryaki O., Ülkücü Ş., Yıldız M. (2013). Phytoremediation An Environmentally Approach to Remove Pesticides from Contaminated Soil. 8th MGPR International Symposium of Pesticides in Food and the Environment in Mediterranean Countries and MGPR Annual Meeting p:45. (Özet Bildiri/) (Yayın No:882600)
- Temur C., Tiryaki O., Akar N., Karnas Z. (2013). Bioremediation a tool for environmental cleaning of pesticide contaminated soil. 8th MGPR International Symposium of Pesticides in Food and the Environment in Mediterranean Countries and MGPR Annual Meeting-111. (Özet Bildiri/) (Yayın No:882597)
- Temur C., Tiryaki O. (2012). Trifluralin Analysis in Wind Eroded Soils by QuEChERS Method. 9th European Pesticide Residue Workshop-EPRW p:322. (Özet Bildiri/) (Yayın No:882596)
- Temur C., Tiryaki O. (2011). Quality Systems for Pesticide Residue Analysis ISO 17025 and OECD GLP. 7th MGPR International Symposium-65. (Özet Bildiri/) (Yayın No:882598)
- Temur C., Tiryaki O. (2010). The use of <sup>14</sup>C labelled compound for the uncertainty measurement in pesticide residue analysis. Pesticides in the Mediterranean Area-36. (Özet Bildiri/) (Yayın No:882599)

#### **D. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:**

- Tiryaki O., Temur C. (2012). Pestisit Kalıntı Analizlerinde Kalite Sistemleri ISO 17025 ve OECD GLP, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 28(4), 270-279., Atıf Sayısı: 0 (Kontrol No: 882587)
- Tiryaki O., Seçer E., Temur C. (2011). Yemlerde Mikotoksin Oluşumu Toksikite ve Mikotoksin Kalıntı Analizleri. Anadolu Dergisi, 21(1), 44-58., Atıf Sayısı: 0 (Kontrol No: 882590)



Temur C., Tiryaki O. (2011). Effect of gamma irradiation on *Penicillium expansum* isolated from Golden Delicious apples. *The Journal of Turkish Phytopath.*, 41(1-3), 1-11., Atıf Sayısı: 0 (Kontrol No: 882588)

**E. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:**

Delen Nafiz, Tiryaki O., Türkseven S.G., Temur C. (2015). Türkiye’de Pestisit Kullanımı, Kalıntı Vedayanıklılık Sorunları, Çözüm Önerileri. Türkiye Ziraat Mühendisliği VIII. Teknik Kongresi, 558-779. (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:4723483).

