



MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

PATATESLERDE PVY, PVX VE PVS VİRÜS HASTALIKLARININ ELISA VE RT-PCR YÖNTEMİYLE TANILANMASI

PELİN GÜNDOĞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Antakya/HATAY

OCAK-2008

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PATATESLERDE PVY, PVX VE PVS VİRÜS HASTALIKLARININ ELISA VE
RT-PCR YÖNTEMİYLE TANILANMASI**

PELİN GÜNDOĞAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Yrd. Doç. Dr. Mona GAZEL danışmanlığında hazırlanan bu tez 10/01/2008 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Yrd.Doç.Dr. Mona GAZEL Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN Doç.Dr.M.Emin ÇALIŞKAN
Başkan Üye Üye

Bu tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. Nejat AĞCA
Enstitü Müdürü

Bu çalışma M. K. Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 07 M 0204

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.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
3.1. Materyal.....	15
3.1.1. Bitki Materyali.....	15
3.1.2. Serolojik ve Moleküler Çalışmalar.....	15
3.2. Yöntem.....	15
3.2.1. Patates yumrularının filizlendirilmesi.....	15
3.2.2. Bitki Materyalinin Muhafazası.....	16
3.2.2.1. Materyalin CaCl ₂ 'de muhafazası	16
3.2.3.ELISA Testinin Uygulanması (DAS-ELISA).....	16
3.2.4. PCR Çalışmaları (Polymerase Chain Reaction=Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	18
3.2.4.1. Nükleik Asit İzolasyonu.....	18
3.2.4.2. Spesifik Primer Çiftleri.....	20
3.2.4.3. Revers Transkripsiyon (RT; Reverse Transcription).....	20
3.2.4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	22
3.2.4.5. PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi: Jel Elektroforez...	24
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	25
4.1. Patates Yumrularının filizlendirilmesi.....	25
4.2. DAS-ELISA.....	25
4.3. RT-PCR Testlemeleri.....	27
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	34
KAYNAKLAR.....	36
TEŞEKKÜR.....	41
ÖZGEÇMİŞ.....	42

EKLER.....	43
EK.1. ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	43
EK.2. Nükleik Asit İzolasyonunda Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	45
EK.3. Agarose Jel Elektroforez.....	46

ÖZET**PATATESLERDE PVY, PVX VE PVS VİRÜS HASTALIKLARININ ELISA VE RT-PCR YÖNTEMİYLE TANILANMASI**

İklim odasında yetiştirilen Lady Rosetta, Lady Olimpia, Russet Burbank, Hermes, Panda, Lady Claire ve Granola patates çeşitlerinde 2006-2007 yıllarında yürütülen bu çalışmada Patates X virüsü (PVX), Patates Y virüsü (PVY) ve Patates S virüsü'nün (PVS) saptanması ve yaygınlık oranlarının DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleriyle belirlenmesi ve sonuçların kıyaslanması amaçlanmıştır. Adı geçen patates çeşitlerinin yumruları filizlendirilmiş, her yumru bir örnek olarak alınmış ve yumruların gelişen yapraklar virüslerin testlenmesinde kullanılmıştır. Patateslerin yapraklarında hiçbir belirtiye rastlanmamıştır. Çalışmada toplam 304 örnek testlenmiştir. Tüm örnekler DAS-ELISA ve RT-PCR'a tabi tutulmuştur. DAS-ELISA testi ile 39 örnek, RT-PCR testleriyle 47 örnek PVY ile enfekteli bulunmuştur. En yüksek PVY enfeksiyonu Russet Burbank, Hermes, Granola, Panda ve Lady Rosetta'da tespit edilmiş, ancak Lady Olimpia ve Lady Claire çeşitlerinde PVY bulunamamıştır. Panda çeşidinde en yüksek PVS'ü saptanırken bunu Lady Claire ve Granola çeşitleri izlemiştir. Benzer şekilde DAS-ELISA testi ile 11 örnek, RT-PCR testleriyle 22 örneğin PVS ile enfekteli olduğu bulunmuştur. DAS-ELISA ile testlenen tüm örneklerde PVX saptanamamış ancak RT-PCR ile 2 örneğin PVX ile enfekteli olduğu ortaya konulmuştur. Testlenen örneklerin sadece 3 tanesi PVY ve PVS ile ve bir tanesi PVY ve PVX ile karışık enfekteli bulunmuştur. Bu çalışma patateslerde önemli üç virüs hastalığının semptom göstermeyen patates bitkilerinde de çok yaygın olduğunu ve RT-PCR yönteminin bu virüslerin saptanmasında ELISA'ya göre çok daha başarılı bir şekilde kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

2008, 47 sayfa

Anahtar kelimeler: Patates, PVX, PVY, PVS, ELISA, RT-PCR.

ABSTRACT**IDENTIFICATION OF PVY, PVX AND PVS VIRUS DISEASE ON POTATOES
BY USING ELISA AND RT-PCR METHODS**

The identification and the prevalence of PVX, PVY and PVS on the Lady Rosetta, Lady Olimpia, Russet Burbank, Hermes, Panda, Lady Claire ve Granola potato cultivars grown in growth room by DAS-ELISA and RT-PCR and the comparison of results were aimed in the study conducted between 2006-2007. The seeds of all potato cultivars were sprouted and then each seed was taken as a sample and the leaves growing out from the seeds were used for virus-testing. No visual symptom was observed on the foliage of potatoes. A total of 304 samples were tested in the study. All samples were used in both DAS-ELISA and RT-PCR testings. 39 and 47 samples were found to be infected with PVY by DAS-ELISA and RT-PCR, respectively. The highest PVY infection was detected on Russet Burbank, Hermes, Granola, Panda and Lady Rosetta, but no infection could be found on Lady Olimpia and Lady Claire by PVY. Following Panda, Lady Claire and Granola cultivars had the highest PVS infection. Similarly, 11 samples were found to be infected with PVS by DAS-ELISA and 22 samples were found to be infected by RT-PCR. Although PVX was not detected in all tested samples by DAS-ELISA, two samples were found to be infected with PVX by RT-PCR. Only three samples were found to be mix-infected by PVY and PVS and one sample was found to be infected by PVX and PVY. The current study revealed the prevalence of three virus diseases on symptomless potato plants, and the success of RT-PCR in the detection of these viruses other than ELISA.

2008, 47 page

Key Words: Potato, PVX, PVY, PVS, ELISA, RT-PCR.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A.B.D	Ana Bilim Dalı
AMV	Alfalfa Mosaic Virus
bp	Baz Çifti (Base pair)
CaCl ₂	Kalsiyum klorit (Calcium chlorite)
cDNA	Komplementer DNA (complementer DNA)
CP	Kılıf proteini (Coat protein)
CMV	Cucumber Mosaic Virus (Hıyar Mozaik Virüsü)
⁰ C	Santigrat derece
d ₂ H ₂ O	Çift destile su
Da	Dalton
ds-RNA	Çift sarmallı RNA (Double-stranded RNA)
DAS-ELISA	Double antibody sandwich-ELISA
dATP	2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	2'-deoxycytidine 5'-triphosphate
dGTP	2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate
dNTP	2'-deoxynucleotide 5'-triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EtBr	Etidyum bromid
EtOH	Ethanol
g	Gram
H ₂ O	Su
HCl	Hidroklorik asit
IC	Immuno capture
KCl	Potasyum klorit
KH ₂ PO ₄	Potasyum di hidrojen fosfat
KOAc	Potasyum asetat
LiCl	Lityum Klorür
M	Molar
mg	Mili gram

MgCl ₂	Magnezyum klorür
M.K.Ü.	Mustafa Kemal Üniversitesi
mix	Karışım
ml	Mili litre
mM	Mili molar
µl	Mikro litre
NaI	Sodyum iyodür
NaCl	Sodyum klorür
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
NaHCO ₃	Sodyum bi karbonat
Na ₂ HPO ₄	Di sodyum hidrojen fosfat
NaOAc	Sodyum asetat
NaOH	Sodyum hidroksit
nm	Nano metre
nt	Nükleotid
OPR	Açık okuma ucu (Open reading frame)
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
pmol	Piko mol
PVA	Patates A Virüsü
PVY	Patates Y Virüsü
PVX	Patates X Virüsü
PVM	Patates M Virüsü
PVS	Patates S Virüsü
PLRV	Patates Yaprak Kıvrıcıklık Virüsü
RNA	Ribonükleik asit
RNase	Ribonükleaz
rpm	Revolution per minute (dakikadaki devir sayısı)
RT	Revers transkripsiyon
RT-PCR	Revers transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu
Tris-HCl	Tris-Hidroklorik asit
TAE	Tris asetat EDTA
UV	Ultraviyole
V	Volt

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. PVX, PVY ve PVS'e spesifik primer çiftleri.....	20
Çizelge 4.1. DAS-ELISA ile testlenen farklı patates çeşitleri ve çeşitlerde saptanan virüsler.....	27
Çizelge 4.2. Patates yumrularında PVY, PVS ve PVX'e karşı gerçekleştirilen RT-PCR sonuçları.....	29

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 3.1. Nükleik asit izolasyonunun şematik gösterimi.....	19
Şekil 3.2. Revers transkripsiyonun şematik olarak açıklanması.....	21
Şekil 3.3. PCR'nin şematik olarak açıklanması.....	23
Şekil 4.1. Yeni filizlenmeye başlayan patates yumruları.....	25
Şekil 4.2. Simptom gelişimi için gözlemlenen bitkiler	26
Şekil 4.3. PVS'e karşı gerçekleştirilen RT-PCR sonucu	30
Şekil 4.4. PVY'e karşı gerçekleştirilen RT-PCR sonucu.....	31
Şekil 4.5. PVX'e karşı gerçekleştirilen RT-PCR sonucu	32

1. GİRİŞ

Güney Amerika kökenli bir bitki olan patatesin (*Solanum tuberosum* L.), günümüzde deniz seviyesinden 4000 m yüksekliğe, 70. kuzey enleminden 50. güney enlemine kadar çok geniş bir alanda yetiştiriciliği yapılmaktadır. Böylesine geniş bir yayılma alanına sahip olmasına rağmen, gerek yetiştirme tekniği gerekse hasat sonrası uygulamaları (depolama, pazarlama, tüketim vb) açısından bölgelere göre önemli farklılıklar bulunmaktadır. Horton (1987) bu farklılıklara dayanarak, dünyada başlıca dört farklı patates üretim sisteminin olduğunu bildirmiştir. Bu sınıflandırmaya göre ülkemiz hem ılıman iklim kuşağı hem de Akdeniz iklim kuşağı olmak üzere iki farklı patates üretim sistemini içinde bulundurmaktadır (Çalışkan, 2001).

Ülkemizin ılıman kuşak üretim sistemi içerisinde özellikle Niğde ve Nevşehir illeri, patates tarımının çok yoğun yapıldığı yöreler olup, üretimin yaz döneminde yapıldığı bu yöreler toprak yapılarının uygunluğu ile de dünyanın en verimli patates bölgelerinden biri durumundadır. Akdeniz iklim kuşağı üretim sistemi içerisinde yer alan Güney ve Batı sahil bölgelerinde ise patates üretimi genel olarak ilkbahar ve sonbahar olmak üzere yılda iki ayrı dönemde yapılabilmeyle beraber verimlilik seviyesi ılıman kuşağa göre daha düşüktür (Çalışkan, 2001). Türkiye’de patatesin toplam ekim alanı yaklaşık 159.348 hektar, toplam üretimi ise 4.397.305 ton civarındadır (Anonim, 2006).

Dünya nüfusunun beslenmesinde en önemli gıda kaynaklarından biri olan patatesteki hastalık, zararlı ve yabancı otlardan kaynaklanan verim kaybı %32 olup, bunun 2/3’lük kısmı hastalık etmenlerinden kaynaklanmaktadır (Agrios, 1997). Bu kültür bitkisinde verim ve kalite azalmasına neden olan faktörlerden biri de virüs hastalıklarıdır (Spiegel ve Martin, 1993). Virüs hastalıklarından bazıları lokal olarak bulunurken, bazıları dünya genelinde önemli derecede ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda 25’den fazla virüsün patatesi enfekte ettiği, bu virüslerden potato leafroll luteovirüs; patates yaprak kıvrılma virüsü (PLRV), potato S carlavirüs; Patates S virüsü (PVS), potato Y potyvirus; patates Y virüsü (PVY) ve potato X potexvirüs; patates X virüsünün (PVX) dünya genelinde şiddetli enfeksiyonlara neden oldukları belirtilmektedir (Hooker 1986). Virüs hastalıkları

tohumluk yumrular ile yıldan yıla, yıl içerisinde de mekanik olarak ya da vektörlerle taşınarak hızlı bir şekilde yayılmaktadır (Jones, 1988). Şimdiye kadar yapılmış olan çalışmalarda, fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerinin aksine virüs hastalıklarının kontrolünde kimyasal mücadelenin doğrudan etkili olmadığı belirtilmiştir (Walkey, 1991). Bundan dolayı patatesten önemli derecede verim kaybına neden olan virüs hastalıklarıyla mücadelede virüs hastalıklarından arı tohumluk kullanılması büyük önem arz etmektedir (Jones, 1988).

Virüslü patates yumrularının tohumluk olarak kullanılması sonucu, virüslerin bir sonraki yıla taşındığı, bununla birlikte vejetasyon periyodu içerisinde de patates virüslerinin mekanik olarak ve çeşitli vektörlerle taşınmasının, her yıl hastalıklı bitki sayısının artmasına neden olduğu ve buna paralel olarak da verimde devamlı olarak azalmanın meydana geldiği kaydedilmektedir (Sahtiyancı, 1972). Nitekim, Erzurum ilinde yapılan bir çalışmada, patates bitkisinde 34 afit türü saptanmış ve bu türlerden 14 tanesinin patates virüs hastalıklarının vektörü olduğu bildirilmiştir (Tahtacıoğlu, 1993).

Patates üretiminin artırılmasında sertifikalı patates tohumluğunun kullanılması büyük önem arz etmektedir. Türkiye’de patates tohumculuk sektörü büyük oranda, ithal edilen anaç kademe tohumluğun ülke içerisinde bir kez çoğaltılarak pazarlanması şeklinde çalışmaktadır. Bu şekilde sertifikalı tohumluk üretim ve tedariki, toplam tohumluk ihtiyacının ancak %8’ini karşılayabilmektedir. Geri kalan tohumluk ihtiyacı ise ikinci ve üçüncü kuşak kuşak tohumlukların tekrar çoğaltılmaları yoluyla karşılanmaktadır. Ancak, tohumluk patates üretiminde kontrollü kademe uygulanmadığı için, bu tohumluklar sertifikasyona tabi tutulamamakta, dolayısıyla da tek kalite güvencesini üreticinin güvenilirliği teşkil etmektedir (Arıoğlu ve ark., 2006).

Türkiye’nin önemli bir patates üreticisi ili olan Erzurum’da çiftçilerin kullandıkları tohumluk patates yumrularının %43.6 oranında PVX, %40.5 oranında PVY, %5.9 oranında PVS, %10 oranında patates yaprak kıvrılma (PLRV) ve ender olarak da patates A (PVA) virüsleri ile bulaşık olduğu saptanmıştır (Çıtır, 1982). Aynı araştırmacı bölgede tohumluk olarak kullanılan patateslerin %95.8 oranında patates virüsleri ile bulaşık olduğunu buna karşın sadece %4.2’lik virüssüz tohumluğa rastlandığını kaydetmiştir. Erzurum ilinde 1994-1995 yıllarında yapılan bir başka çalışmada PVX’in hastalık oranının ortalama %46.78, PVS’nin ise %23.95 olduğu saptanmış ve etmenler dsRNA analizi ile tanılanmıştır (Bostan, 1996). Türkiye’de

patates üretiminin yoğun olarak yapıldığı Bolu, Erzurum, İzmir, Nevşehir ve Niğde illerinde tohumluk olarak kullanılan yumruların ortalama %6.4 PVS, %6.9 PVX ve %16.8 oranında ise PVY ile enfekteli olduğu belirlenmiştir (Bostan ve Haliloğlu, 2004).

Avila ve ark. (1989), ve Samson ve ark. (1993), patateslerde bulunan virüslerin saptanmasında kullanılacak tanı tekniklerinin duyarlılık, süratlilik, doğruluk, süreklilik, maliyet ve uygulamada kolaylık gibi özellikleri taşıması gerektiğini belirtmişlerdir. ELISA ve moleküler tekniklerden PCR'ın virüslerin saptanmasında kolaylıkla kullanılabilceği belirlenmiştir (Singh ve Somerville, 1992; Barker ve ark., 1993; Spiegel ve Martin, 1993). PCR'ın ELISA'ya göre 100-10.000 kat daha duyarlı ve spesifik olduğu (Vunsh ve ark., 1990; Koerschneck ve ark., 1991; Rowhani ve ark., 1995); virüslerin dormant yumrularda PCR ile belirlenebilmesine karşın ELISA ile duyarlı ve güvenilir şekilde belirlenemediği ve dormansilerinin kırılmasına gereksinim duyulduğu belirtilmiştir (Spiegel ve Martin, 1993; Singh ve Singh, 1996; Loebenstein ve ark., 1997; Russo ve ark., 1999; Singh ve ark., 1999).

Barker ve ark. (1993), patates yumrularında Antibody-trapped antijen-ELISA (ATA-ELISA) ve PCR yöntemlerini kullanarak karşılaştırmışlardır. Hem PCR hem de ATA-ELISA hasattan sonra 3 hafta saklanmış yumrularda veya Record çeşidinden gelişen bitkilerden alınan yumrularda PVY güvenle ortaya konulabilmiştir. 10°C'de 20 hafta süreyle saklanan yumrularda PVY oldukça az oranda ortaya koyulmuştur. Virüs ATA-ELISA yöntemi ile enfekteli bitkilerin yumrularının sadece yarısında ortaya konulmuştur. Buna karşın PCR ile PVY yaklaşık 20 haftalık depolanan enfekteli yumrularda çok etkili olmayarak PCR ile ortaya koyulmuştur.

Son yıllarda moleküler çalışmalarda hızla ilerlemeler kaydedilmiş ve microarray teknolojisi kullanılarak PVX, PVY, PVA ve PVS başarılı bir şekilde ortaya koyulmuştur (Boonham ve ark., 2003). PVA, PVS, PVM, PVX, PVY ve PLRV'i hem tekli hem de karışık enfeksiyonlar şeklinde uygun bir microchip ortaya koymuşlardır. Bu mikrochip PVY ve PVS'nin strainlerini geliştirerek ayırt etmede kullanılmıştır (Bystricka ve ark., 2005). Nie ve Singh (2000), oligo (dT) kullanarak tam uzunluktaki cDNA'ları sentezlemişler ve multiplex RT-PCR ile PVS, PLRV, PVX, PVA ve PVY'yi saptamışlardır.

Bugüne kadar yurt dışında ileri moleküler tekniklerle patates virüslerinin teşhisi başarıyla yapılmış ve birçok araştırmacı tarafından yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Ancak ülkemizde patates virüslerinin teşhisi daha çok ELISA ile (Bostan ve Haliloğlu, 2004; Bostan, 1996; Yılmaz ve ark., 2004; Özdemir, 2006; Gümüş ve Erkan, 1998) yapılmış PCR (Bostan ve ark, 2006) ile yapılan çalışmalar oldukça sınırlı kalmıştır.

Bu çalışma ile patateslerde verimi önemli ölçüde etkileyen PVX, PVY ve PVS'nin ELISA ve RT-PCR ile saptanması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda testlenen patateslerdeki virüs hastalıklarının yaygınlık oranları belirlenerek, olası bir sertifikasyon programında bu testlerin kullanım olanakları tartışılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Solanaceae familyası içinde yer alan patates (*Solanum tuberosum* L.), dünya nüfusunun beslenmesinde temel gıda kaynakları arasında yer alan bir çapa ve sanayi bitkisidir. Patates %17.5 nişasta, %2 civarında protein, B1, B2, B6 ve C vitamini ile birlikte bazı elementleri içermesi nedeniyle insanlar için önemli bir gıda kaynağı olup, aynı zamanda nişasta ve alkol endüstrilerinin de hammaddesini oluşturmaktadır (Ötles ve Akçiçek, 2002). Türkiye’de patatesin toplam ekim alanı yaklaşık 159.348 hektar, toplam üretimi ise 4.397.305 ton civarındadır (Anonim, 2006).

Beslenme açısından çok önemli gıda maddelerinden biri olan patates aynı zamanda çok önemli bir endüstri ham maddesidir. Patatesin Türkiye’ye ilk kez 1870’li yıllarda kuzeyden Rusya ve Kafkasya üzerinden geldiği, Doğu Anadolu ve Karadeniz yaylalarında yetiştirildiği ve daha sonra batılı ülkelerden Trakya Bölgesi’ne girdiği bildirilmektedir (Günel, 2002). Bugün ise, Türkiye’nin hemen hemen her ilinde patates üretimi yapılmaktadır. Ülkemizde gerek artan nüfusun beslenmesi, gerekse patatese dayalı sanayinin hammadde isteklerinin karşılanması ile ithalat ve ihracat açısından kaliteli ve fazla ürün elde etmek amacıyla, hastalıklardan arı patates üretiminin yapılması gerekmektedir.

Patates bitkisinde hastalık, zararlı ve yabancı otların neden olduğu verim kaybının %32 olduğu ve bunun 2/3’lük kısmının hastalık etmenlerinden kaynaklandığı belirlenmiştir (Agrios, 1997). Patateslerde verim ve kalite kaybına neden olan etmenlerden birisi de virüs hastalıklarıdır (Spiegel ve Martin, 1993). Virüs hastalıklarından bazıları lokal olarak bulunurken, bazıları dünya genelinde önemli derecede ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda 25’den fazla virüsün patatesi enfekte ettiği, bu virüslerden potato leafroll luteovirus; patates yaprak kıvrılma virüsü (PLRV), potato S carlavirus; patates S virüsü (PVS), potato Y potyvirus; patates Y virüsü (PVY) ve potato X potexvirus; patates X virüsü (PVX), potato A virus; patates A virüsü (PVA), potato M virus; patates M virüsü (PVM), alfa mosaic virus; yonca mozaik virüsü (AMV) ve cucumber mosaic virus; hıyar mozaik virüsü (CMV)’nün dünya genelinde şiddetli enfeksiyonlara neden oldukları

belirtilmektedir (Schilde-Rentschler ve Scmiediche, 1984; Hooker 1986, Slack, 1995, Salazar, 1996).

Virüs hastalıklarının tohumluk yumrularla, mekanik olarak yada vektörlerle hızla yayıldığı ortaya koyulmuş (Jones, 1988) ve bu hastalıkların mücadelesinde kimyasal mücadelenin doğrudan etkili olmadığı belirtilmiştir (Walkey, 1991). Bundan dolayı patatesten önemli derecede verim kaybına neden olan virüs hastalıklarıyla mücadelede virüs hastalıklarından arı tohumluk kullanılması büyük önem arz etmektedir (Cortbaoui, 1984; Jones, 1988).

PVY patates, biber, domates, tütün gibi Solanaceae familyasındaki bir çok kültür bitkisinin yanında *Solanum nigrum* (köpek üzümü) gibi bazı yabancı otu da enfekte eder. PVY'nin strainleri 3 farklı grupta (PVY^o, PVY^N, PVY^C) toplanır. PVY^o (yaygın tip) dünyada patates yetiştirilen birçok ülkede yaygındır. Doğu Avustralya, Güney ve Kuzey Amerika, Yeni Zellanda, Avrupa, Güney Afrika; PVY^N Kuzey ve Güney Amerika'da, Yeni Zellanda'da, Avrupa'da ve Afrika'da bulunur. PVY^{NTN} yumru nekrozuna neden olan yeni bir tiptir. Avrupa'da, Yeni Zellanda'da, Orta Doğu'da, Kuzey Amerika ve Japonya'da ortaya koyulmuştur (Jones ve ark., 2003).

PVY^o ve PVY^C'nin simptomları PVY^N'e göre daha şiddetli olup, yaprak beneklenmesi, sararması, yaprak deformasyonu, nekrotik yaprak lekeleri ve halkaları, damarlarda nekroz, yaprak dökülmesi ve gövdenin vaktinden önce ölümü şeklinde görülür. Bu strain ile enfekteli bitkilerin tepesinde çalimsı büyüme ve gövdenin alt kısmında daha az yaprak görülür. PVY^N daha hafif yaprak beneklenmesi oluşturur. PVY^o ve PVY^C ve PVY^N ile enfekteli bitkilerin yumruları normal görülür. PVY^{NTN} ile enfekteli yumrunun kabuğunda düzensiz kahverengimsi halkalar görülür, daha sonra bu lekeler nekrotiğe döner ve yumru içe çöker. PVY'nin simptomları patates çeşidine, virüs strainin virülensine bağlı olarak oldukça değişkenlik gösterir (Jones ve ark., 2003).

PVX'in oluşturduğu simptomlar zayıftan çok zayıfa kadar değişir, hatta çoğu zaman ortaya koymak zordur. Patates X virüsünün 4 ırk grubu (X¹, X², X³ ve X⁴) tanımlanmıştır. Bazı varyetelerde PVX'in yaklaşık %15'e varan oranlarda verim kaybına neden olduğu belirlenmiştir. Hassas patates çeşitlerinde damarlar arasında mozaikler gelişir. Simptomlar bulutlu havalarda, gölgede ve 16-20°C sıcaklıklarda daha iyi görülür. Solanaceae familyası üyelerinden tütün, domates ve biber de PVX tarafından enfektelenirler (Kirkwood, 2002).

PVX dünyada tüm alanlarda yaygın olarak bulunmaktadır. PVX mekanik taşınmayla, örneğin bitkinin bitkiye teması, budama aletleriyle ve tohumla taşınır. Etmenin bazı çiğneyici ağız yapısına sahip böceklerle taşınabildiği ancak afitlerle taşınmadığı bildirilmiştir. PVX belirtileri genelde latentsir ve çıplak gözle görünmezler. PVX yapraklarda hafif beneklenmeden şiddetli mozayığe, bitkide bodurlaşmaya, yapraklarda küçülmeye kadar değışen şekillerde belirtiler oluşturur. PVX diğeri virüslerle beraber bulunduğunda bitkilerde önemli verim azalmasına neden olduğu belirlenmiştir (Kirkwood, 2002).

PVS patateslerde çok yaygın görülen bir virüs olup bir çok patates çeşidinde hemen hemen belirtimsiz olarak bulunur. PVS'nün bitkide tek olarak bulunduğunda verim kaybına neden olup olmadığı tartışılmaktadır, ama kayıpların % 10-20 olduğu rapor edilmiştir. PVS, enfekteli bitki özsuyla mekanik yolla çok kolay taşınırken tarlada bitkilerin birbirine teması, budama aletleri ve yumruyla da taşınır. PVS'nin nadiren böcekler ile de taşındığı bildirilmiştir (Kirkwood, 2002).

Bostan ve Açıkğöz (2000), PVX ve PVS'nün bazı test bitkilerinde oluşturduğu belirtilerin belirlenmesi ve bu virüslerin dsRNA analizi ile tanılanması amacı ile bir çalışma yapmışlardır. PVX'in izolasyonunda *Datura stramonium*, çoğaltımında *Nicotiana glutinosa* bitkisi kullanılmıştır. Yapılan mekanik inokulasyonlar sonucunda PVX'in *Chenopodium album*, *C. amaranticolor* ve *C. quinoa* bitkilerinde lokal lezyon; *Gomphrena globosa*'da nekrotik lokal lezyon; *D. stramonium*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana benthamiana*, *N. debneyii*, *N. glutinosa*, *N. sylvestris*, *N. tabacum* Samsun NN, *N. tabacum* Samsun Typ, *N. tabacum* White Burley, *N. tabacum* Xanthii ile *Physalis floridana* bitkilerinde ise sistemik belirtilere neden olduğu buna karşı *N. clevelandii* ve *N. rustica* bitkilerinde ise herhangi bir belirtimden neden olmadığı belirlenmiştir. PVS virüsünün izolasyonunda *C. quinoa* çoğaltımında ise *N. clevelandii* bitkisi kullanılmıştır. Yapılan mekanik inokulasyonlarda, PVS'nin *C. album*, *C. amaranticolor* ve *C. quinoa* bitkilerinde lokal lezyon; *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. debneyii*, *N. glutinosa*, *N. sylvestris*, *N. tabacum* Samsun Typ., *N. tabacum* White Burley ile *N. tabacum* Xanthii bitkilerinde sistemik belirtilere neden olduğu, buna karşı *N. rustica*, *G. globosa*, *D. stramonium*, *L. esculentum*, *N. tabacum* Samsun NN ve *P. floridana* bitkilerinde ise herhangi bir belirtimden oluşturmadığı belirlenmiştir. PVX'e ait dsRNA'lar *N. glutinosa* ve *N. tabacum* Xanthii, bitkilerinden izole edilmiştir.

PVS'ye ait dsRNA'lar ise *C. quinoa* bitkilerinden izole edilmiştir. Sonuçta, PVX'in tek banda sahip dsRNA profili elde edilirken, PVS virüsüne ait dsRNA profili elde edilememiştir.

Bitkilerde hastalığa neden olan 370 bitki virüsünün % 66'sının nakli yaprak bitleri (Aphididae, Homoptera) tarafından gerçekleştirilmektedir. Patateste yaprak biti ile taşınan virüs hastalıkları arasında PLRV, PVY, PVA, PVM, PVS ve AMV yer almaktadır. Bu virüslerden PVA ve PLRV persistent olarak taşınırken, PVY, PVA, PVM, PVS ve AMV nonpersistent olarak taşınırlar. Virüsler ile vektörler arasındaki ilişkiler ise son derece karmaşık olup, taşınmanın gerçekleşmesi için virüsün enfekteli bitkiden vektör tarafından alınması, saklanması ve inokule edilmesi gerekmektedir. Patateste virüslerin taşınmasında rol oynayan ve dünya genelinde yaygın olan en önemli yaprak biti türleri; *Myzus (Nectarasiphon) persicae* (Sulzer), *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas), *Aphis nasturtii* Glover, *Aulocorthum solani* (Kaltenbach), *Aphis gossypii* Glover, *Aphis fabae* Scopoli ve *Rhopalosiphoninus latysiphon* (Davidson)'dur (İlhan ve ark., 2006) .

Virüslerin vektörler tarafından taşınmasının engellenmesinde özellikle virüs, vektör ve konukçu ilişkilerinin çok iyi bilinmesi etkili bir mücadele açısından önemlidir. Ilıman iklimlerde PVY'nin çok sayıda tek yıllık yabancı ot konukçusunun olduğu belirlenmiştir (Salazar, 1996). Bunlardan çoban çantası (*Capsella bursa-pastoris* L.), uzun meyveli bülbül otu (*Sisymbrium altissimum* L.) (Woodford, 1988; Thomas ve ark., 1997b) ve şeytan elması (*Datura stramonium* L.) bitkisinin hem PLRV'nin hem de *M. persicae*'nin konukçusu olduğu ortaya koyulmuştur (Hanafi ve ark., 1995).

Patateste önemli derecede verim kaybı oluşturan ve dünyada patates tarımının yapıldığı her yerde yaygın olduğu belirlenen virüslerden PVY'nin ellinin üzerinde afit türü tarafından nonpersistent olarak taşınabildiği; fakat bu afitlerin büyük çoğunluğunun patates bitkisinde kolonize olmadığı (Harrington ve Gibson, 1986; Heimback ve ark., 1998) ve PVY'nin de PLRV gibi en etkili vektörünün *M. persicae* olduğu saptanmıştır (MacGillivray, 1981). Bununla birlikte, PVY virüsünün ekim alanlarında etkin bir şekilde taşınmasında patates bitkisinde kolonize olmamalarına rağmen dışarıdan gelen çok sayıda afit türünün kanatlı formlarının da önemli rol oynayabileceği kaydedilmiştir (DiFonzo ve ark., 1996). Ancak, Kanada'da iki farklı bölgedeki patates dikim alanlarında yapılan çalışmada *Capitophorus elaeagni* (delGuerc.), *Diuraphis noxia*

(Kurdj.), *Metopolophium dirhodum* (Walk.), *Rhopalosiphum maidis* (Fitch.), *Rhopalosiphum padi* (L.), *Sitobion avenae* (Fab.), *Schizaphis graminum* (Rond.), *M. persicae*, *Brevicoryne brassicae* (L.) ve *Acyrtosiphon pisum* (Harr.) türlerinin haricinde diğer farklı afit türlerinin de patates ekim alanlarındaki tuzaklardan toplandığı, laboratuvar şartlarında yapılan çalışmalarda ise sadece *M. persicae* ve *D. noxia* türlerinin PVY'yi taşıdıkları belirlenmiştir (Halbert ve ark., 1993). Diğer taraftan, virüslerin afitler tarafından taşınmasının oldukça kompleks olduğu, taşınma etkinliğinin afit türüne, afitin biyolojik dönemine ve virüsün ırkına göre değiştiği de belirtilmiştir (Harrington ve Gibson, 1989).

Patates virüslerinin yayılmasını etkileyen ana faktörler arasında tohumluk patateslerdeki başlangıç virüs inokulumu, patates üretimindeki tarımsal uygulamalar, üründe yaprak bitlerinin kolonizasyonu, yaşam döngülerindeki ve davranışlarındaki çeşitlilik, çevresel faktörlerin populasyon dinamikleri üzerine etkileri, fenolojisi ve olgun bitki dayanıklılığı arasındaki interaksiyon yer alır. Üründeki virüs varlığının tespitinin geçerliliği, güvenilirliği ve vektör yaprak bitleri ile kimyasal mücadele, hastalıkların yayılmasının önlenmesinde son derece önemli yer tutmaktadır (İlhan ve ark., 2006).

Patates vejetatif olarak yumrularıyla üretilen bir kültür bitkisi olması nedeniyle fungus, bakteri, virüs ve benzeri bitki patojenleri tarafından artan bir şekilde enfekte olmakta, buna bağlı olarak da verim ve kalitede önemli düşüşler meydana gelmektedir (Shepard ve Claflin, 1975; Hu ve Wang, 1983; Tovar ve ark., 1985; Hooker, 1986; Avila ve ark., 1989). Bu hastalık etmenlerinden özellikle virüsler, sistemik enfeksiyonlara neden olarak bitkinin toprak üstü aksamından yumrulara geçmekte, bu enfekteli yumruların dikilmesi ile yıldan yıla taşınmakta ve sonuçta patatesteki tohumluk dejenerasyonuna neden olmaktadır (Bokx ve Mool, 1974; Sahtiyancı, 1990). Diğer taraftan, virüs hastalıklarının doğrudan kimyasal mücadele ile kontrolü oldukça zor olup (Jayasinghe, 1988; Walkey, 1991), virüs hastalıklarının patates bitkisinde neden olduğu belirtilen semptomları görmek ve semptomlarına göre ayırt etmek çoğu zaman da yanıltıcıdır. Zira patates bitkisinde virüslerin neden oldukları semptomların şiddeti, virüsün tipine, ırkına, patates çeşidine, çevre şartlarına, enfeksiyon zamanına, virüslerin tek ya da birlikte olma durumlarına göre değişim göstermektedir (Beemster ve Rozendal, 1972; McMoran ve Allen, 1983; McDonald, 1984; Hooker, 1986; Avila ve ark., 1989).

Bununla birlikte, özellikle tohumculuk açısından da önemli olan bölgelerde patatesten verim kaybına neden olan patojenlerden önemli olan virüsleri uygun yöntemlerle tanılamak ve bu doğrultuda etkili mücadele yöntemlerini uygulamak gerektiği belirlenmiştir.

Diğer kültür bitkilerinde olduğu gibi patatesteki virüslerin tanınmasında kullanılacak tekniklerin duyarlılık, süratlilik, doğruluk, süreklilik, maliyet ve uygulamada kolaylık gibi özellikleri taşıması gerektiği belirtilerek (Avila ve ark., 1989; Samson ve ark., 1993); serolojik bir tanı tekniği olan ELISA ile moleküler tekniklerden PCR'in bu özellikleri taşıdıkları kaydedilmiştir (Singh ve Somerville, 1992; Barker ve ark., 1993; Spiegel ve Martin, 1993). PCR'in ELISA'ya göre 100-10.000 kat daha duyarlı ve spesifik olduğu (Vunsh ve ark., 1990; Koerschneck ve ark., 1991; Rowhani ve ark., 1995); virüslerin dormant yumrulara PCR ile belirlenebilmesine karşın ELISA ile duyarlı ve güvenilir şekilde belirlenemediği ve dormansilerinin kırılmasına gereksinim duyulduğu belirtilmiştir (Spiegel ve Martin, 1993; Singh ve Singh, 1996; Loebenstein ve ark., 1997; Russo ve ark., 1999; Singh ve ark., 1999). Langeveld ve ark. (1991) potyvirus grubunun birçok üyesini saptamada PCR tekniğinin kullanılabileceğini rapor etmişlerdir. Depolama sırasında yumrulardaki virüs konsantrasyonunun azalmasından dolayı, dormant patates yumrularında PVY'nin çok zor saptandığını bildirmişlerdir (De Bokx ve Cuperus, 1987). Eğer dormansi Rindite gibi büyüme düzenleyici ile kırılır ve 4-6 hafta süreyle saklanırsa PVY'nin güvenli bir şekilde ortaya koyulabileceği belirlenmiştir (Vetten ve ark., 1983). Ayrıca 30°C civarında sıcaklıkta yetiştirilen bitkilerde (Loebenstein ve ark., 1997) ve virüse karşı dayanıklı çeşitlerde virüs yoğunluğunda meydana gelen düşüşten dolayı ELISA tekniğinin virüsleri belirlemede yeterli olmadığı saptanmıştır (Barker ve Woodford, 1992; Thomas ve ark., 1997a).

Sahtiyancı (1972), virüslü patates yumrularının tohumluk olarak kullanılması sonucu, virüslerin bir sonraki yıla taşındığı, bununla birlikte vejetasyon periyodu içerisinde de patates virüslerinin mekanik olarak ve çeşitli vektörlerle taşınmasının, her yıl hastalıklı bitki sayısının artmasına neden olduğu ve buna paralel olarak da verimde önemli kayıpların meydana geldiğini kaydetmiştir. Türkiye'de patates yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı bölgelerde Kurçman (1979), Çıtır (1982), Özbayram (1982), Azeri ve ark. (1985), tarafından yaygın olarak buldukları kaydedilmiş olan bu

virüslerin neden oldukları verim kayıplarının önlenmesi için sertifikalı tohumluk kullanılmasının bir zorunluluk olması gerektiği bildirilmiştir.

Yugoslavya'da PVY'nin %10-100 oranı ile en yaygın virüs olduğu, PLRV'nin % 10-100, PVX'in % 10-17, PVA'nın % 0-25, PVS'nin % 0-12 oranında bulunduğu ELISA ile ortaya konulmuştur (Gavran, 1997).

Kuzey Amerika'da Washington ve Oregon'da patates tohumu yetiştirilen alanlarda PVY⁰ straini sırasıyla % 16.4 ve % 25.9 oranında bulunmuş, 2002 yılından 2003 yılına kadar tohumlarda PVY^{N:O} straini ile enfekteli olma oranının önemli bir şekilde artmış olduğu ortaya konulmuştur (Croslin ve ark., 2006).

İlk defa Karaca (1961), PVX'nün ülkemizde bulunduğunu ileri sürmüştür. Batı Anadolu'da semptomatolojik ve serolojik yöntemlerle yapılan bir başka çalışmada ise, PVX ve PVS'nün bulunduğu belirlenmiştir (Özalp, 1964). Fakat, PVX ve PVS ile ilgili olarak ülkemizde yapılan bu çalışmaların yetersiz olduğu görülmüştür. Bu araştırmaları patatesin taşınma yollarının araştırıldığı çalışmalar izlemiştir. Şahtiyancı (1972a), virüslü yumruların dikilmesi ile virüslerin bir sonraki yıla taşındığını, bununla birlikte patates virüslerinin mekanik yolla ve vektörlerle taşınmasının her yıl hastalıklı bitki sayısının artmasına neden olduğunu ve dolayısıyla da verimde sürekli azalmalar meydana geldiğini kaydetmiştir. Araştırmacı, PVX'nün bitki özsuyla ve yumru kesimi sırasında bıçakla taşındığını ancak vektörlerle taşınmadığını ve virüsün patatesten % 10-20 düzeyinde verim kaybı meydana getirdiğini de bildirmiştir.

Adana, Antalya, Gaziantep, Hatay, İçel ve Kahramanmaraş illeri patates ekiliş alanlarındaki virüs hastalıkları ile bulaşma oranlarının semptomatolojik teşhisi ve indikatör bitkilerle yapılan indeksleme gözlemleri hakkında yapılan çalışmada, bölgede yetiştirilen patateslerde; PVX, PVY, PLRV, *Aucuba baciliform badnavirüs (AuBV)* ve *Cadi süpürgesi* virüsü tespit edilmiştir. Sayım sonuçlarına göre hastalıkların bulaşma oranları; Gaziantep'te % 31.2, Hatay'da % 26.6, İçel'de % 25.3, Adana'da % 22.8, Kahramanmaraş'ta % 15.8 ve Antalya'da % 13.5 olarak kaydedilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda, patates bitkisine önemli derecede zarar veren bu hastalıklara karşı, üreticinin virüsten arı patates tohumluğu kullanması, kültürel önlemlere uyması, ve virüslerin taşınmasına neden olan vektörlere karşı mücadele yapılması gerekmektedir (Dolar ve ark., 1976).

Başka bir araştırma, Ankara'nın Çubuk ilçesine bağlı bazı köylerdeki patates ekim alanlarında yürütülmüş ve virütik belirti gösterdiğinden şüphe edilen patates bitkilerinden örnekler alınmıştır. Daha sonra, toplanan örneklerden otsu test bitkilerine yapılan inokulasyon sonucunda, PVX ve PVY'nün bir ırkı saptanmıştır. Araştırmacı, PVX'nün zayıf ırkının % 30-40, kuvvetli ırkının ise % 50-60 ürün kaybına nedem olduğunu kaydetmiştir. Bu belirtileri gösteren tarlalarda yapılan sayımda, bitkilerin % 24-80 oranında PVX ve % 10 civarında da PVY ve PVA ile bulaşık oldukları bildirilmiştir (Kurçman, 1979).

Türkiye'de patates tohumluk ihtiyacı önemli oranda firmaların yurt dışından ithal ettikleri tohumlukların çoğaltılarak çiftçilere dağıtılması ile karşılanmaktadır. Ancak virüslerle bulaşık olup olmadığını belirleme konusunda hiçbir testleme yapılmamaktadır. Türkiye'nin önemli bir patates üretim yeri, merkezi olan Erzurum'da çiftçilerin kullandıkları tohumluk patates yumrularının %43.6 oranında PVX, %40.5 oranında PVY, %5.9 oranında PVS, %10 oranında PLRV ve ender olarak da PVA virüsleri ile bulaşık olduğu saptanmıştır (Çıtır, 1982). Aynı araştırmacı bölgede tohumluk olarak kullanılan patateslerin %95.8 oranında patates virüsleri ile bulaşık olduğunu buna karşın sadece %4.2'lik virüssüz tohumluğa rastlandığını kaydetmiştir. Erzurum ilinde 1994-1995 yıllarında yapılan bir başka çalışmada PVX'in hastalık oranının ortalama %46.78, PVS'nin ise %23.95 olduğu saptanmış ve etmenler dsRNA analizi ile tanılanmıştır (Bostan, 1996).

Bostan ve Haliloğlu (2004), Türkiye'de patates üretiminin yoğun olarak yapıldığı Bolu, Erzurum, İzmir, Nevşehir ve Niğde illerinde tohumluk olarak kullanılan yumruların ortalama %6.4 PVS, %6.9 PVX ve %16.8 oranında ise PVY ile enfekteli olduğunu belirlemişlerdir. Tokat ilinde yapılan bir başka çalışmada, Kazova ve Niksar ovalarında üretimi yapılan tohumluk patates yumrularında, biyolojik ve serolojik yöntemler kullanılarak PVX, PVY ve PLRV tespit edilmiştir (Çıtır ve ark., 1999).

Bu amaçla Erzurum patates ekiliş alanlarından toplanan ve ELISA testi yapılan 270 örnek, daha sonra biyolojik indeksleme işlemine tabi tutulmuştur. Araştırma sonuçlarına göre, %42.2 PLRV, %38.3 PVX, %7 PVY enfeksiyonları ile %6.29 PVX+PLRV, %2.96 PVX+PVY ve %1.48 PLRV+PVY'nün karışık enfeksiyonları tespit edilmiştir (Yardımcı ve Bostan, 1999).

PVX ve PVY'lerinin tek ve birlikte bulduklarında Granola, Pasinler 92 ve Caspar patates çeşitlerinde oluşturdukları simptomların ortaya konması ve etmenlerin DAS-ELISA ile tanınması amacıyla yapılan çalışmada PVX ile enfekteli Granola çeşidine ait bitkilerin %39'unda, Pasinler 92'de %46'sında ve Caspar'da %25'inde fark edilebilir herhangi bir simptom görülmezken; diğer bitkilerde mozaik simptomu görülmüştür. PVY ile enfekteli Granola çeşidinde bitkilerin %32'sinde, Pasinler 92'de %39'unda, Caspar'da ise %26'sında belirgin bir simptom görülmezken; Granola çeşidinde %68, Pasinler 92'de %55 ve Casper çeşidinde ise bitkilerin %52'sinde yapraklarda hafif bir sarılık görülmüştür. Çeşitlerde PVY'nin neden olduğu bir diğer simptom ise nekrotik çizgi simptomu olup, bu simptom Granola çeşidinde görülmezken; Pasinler 92'de %6, Caspar'da ise %22 oranında görülmüştür. Ayrıca PVY'nin bitkilerde gelişme geriliği ile yapraklarda dökülmelere neden olduğu saptanmıştır. PVX ve PVY virüslerinin birlikte bulunduğu durumda Granola ve Pasinler 92 çeşitlerinin yapraklarında mozaik simptomunun daha belirgin olarak ortaya çıktığı, Casper çeşidinde ise bitkilerin yapraklarında şiddetli mozaik yanında, yaprak yüzeyinde kabarma, yapraklarda kıvrırcıklaşma ve bitkilerde belirgin bir gelişme geriliği görülmüştür (Bostan ve Demirci, 2001).

2001 yılında Tokat ilindeki bazı ilçelere bağlı 12 köyden toplanan 168 adet bitki örneğinde, patates virüs hastalıkları ile bunların yayılışlarını belirlemek amacıyla bir çalışma yürütülmüştür. Çalışmada kullanılan DAS-ELISA yöntemi ile testlenen örneklerin %22.62'sinin PVX ve %20.83'ünün PVS ile bulaşık olduğu belirlenmiştir. Yörede PVY ve PLRV'ne rastlanılmamasına karşın, karışık enfeksiyonlarda bu virüslerin de varlığı saptanmıştır. Karışık enfeksiyonlarda PVX+PVS'nin %26.19 ile ilk sırayı aldığı belirlenirken, %2.98 PLRV+PVY, %2.98 ile PVX+PVS+PVY ve %5.95 ile PVX+PVS+PLRV enfeksiyonları saptanmıştır (Yılmaz ve ark., 2004).

Afyon ili Sandıklı ilçesinde, çeşit tescil amacıyla yetiştirilen Donald patates çeşidinin yumruları üzerinde yuvarlak veya çizgi şeklinde kahverengi nekrotik lezyonların olduğu, bu lezyonların önce siğil şeklinde kabardıkları ve daha sonra koyu kahverengi renk alarak çatladıkları görülmüştür. Ayrıca, belirti gösteren yumruların enine kesitlerinde lezyonların alt kısmındaki dokularda kahverengi nekrotik alanların olduğu dikkati çekmiştir. Belirti taşıyan yumruların test bitkilerine yapılan mekanik inokulasyonlar sonucunda yapraklarda; sistemik mozaik, deformasyon, damar

bantlaşması, damar nekrozu, yapraklarda ölüm ve bitkide bodurlaşma gibi belirtilerin ortaya çıktığı gözlenmiştir. Bunun yanında yumru örneklerinde DAS-ELISA yöntemiyle; patates Y virüsü – tütün damar nekroz ırkı (PVY^N), PVX ve PLRV adlı etmenlerin varlığı araştırılmıştır. Yapılan biyolojik indeksleme ve ELISA testi sonucunda, patates yumru örneklerinde PVY^N enfeksiyonunun bulunduğu ve PVX ile PLRV adlı etmenlerin olmadığı saptanmıştır. Bu çalışma bulguları ile patates yumrularındaki PVY^N'nin varlığı Orta Anadolu Bölgesinde ilk olarak saptanmıştır (Özdemir, 2006).

Özellikle patateste, virüslerin taşınmasında önemli etkili olan tohumluk araştırmaları ile ilgili olarak, Gümüş ve Erkan (1998) DAS-ELISA yöntemini kullanarak virüslerin varlığını belirlemek için bir çalışma yürütmüştür. Çalışmanın sonucunda toplanan örneklerde PLRV (%14), PVX (%11) ve PVY (%18) enfeksiyonları olduğu tespit edilmiştir.

Türkiye'de bugüne kadar patates yetiştiriciliğini etkileyen virüs hastalıkları konusunda yapılan ilk çalışmalar gözlenen semptomlara göre yapılmıştır. Daha sonraki yıllarda ELISA ve biyolojik indeksleme yapılarak patates virüsleri belirlenmiştir. Ancak patates virüslerinin PCR ile hızlı, güvenilir ve duyarlı testlenmesi konusunda yapılan çalışmalar çok az sayıdır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Bitki Materyali

Ülkemizde yetiştirilmekte olan Lady Rosetta, Lady Olimpia, Russet Burbank, Hermes, Panda, Lady Claire ve Granola çeşitlerine ait sertifikalı tohumluk yumrular kullanılmıştır.

3.1.2. Serolojik ve Moleküler Çalışmalar

ELISA testlerinde kullanılan antiserum ve konjugatlar Loewe (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Ayrıca içerikleri ekte verilen Fosfat tamponu, Yıkama Tamponu, Kaplama Tamponu, Örnek Tamponu, Konjugat Tamponu ve Substrat Tamponu (Ek.1) ile 8x12'lik U şeklinde çukurlara sahip mikrolakalar kullanılmıştır. Nükleik asit izolasyonu için ise bitki ezme ortamı, EtOH, Isopropanol, EDTA, Potasyum asetat süspansiyonları (Ek.2) kullanılmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Patates Yumrularının Filizlendirilmesi

Çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü iklim odalarında yürütülmüştür. Lady Rosetta, Lady Olimpia, Russet Burbank, Hermes, Panda, Lady Claire ve Granola çeşitlerinden alınan yumrular 100 ppm dozundaki gibberellik asit solusyonunda 10 dakika süreyle tutulduktan sonra karanlık bir ortamda filizlenmeleri teşvik edilmiştir. Filizlenme başladıktan sonra her bir çeşide ait yumrular 3'erli gruplara ayrılarak saksılara dikilmiş, saksıların üzerine çeşit adları ve yumru numarası yazılmıştır. Saksılar iklim odasında tutularak gelişen filizlerin yaprak

oluşturmaları sağlanmıştır. Dikilen patateslerin büyümeleri düzenli olarak takip edilmiştir. Yaklaşık10-12 cm'e ulaşan sürgünlerden alınan yapraklar DAS ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ve nükleik asit izolasyonu için kullanılmıştır.

3.2.2. Bitki Materyalinin Muhafazası

Yaklaşık 10-12 cm uzunluğuna erişen patates bitkilerinden alınan yapraklar gruplara ayrılarak farklı koşullarda ve şekillerde muhafaza edilmiştir. İşleme tabi tutuluncaya kadar öncelikle +4⁰C'de muhafaza edilen bitki materyallerinin bir kısmı CaCl₂'de kurutulmak üzere hazırlanmış, bir kısmı da gliserol içerisinde falcon tüplerde -20⁰C'de saklanmıştır. Ayrıca bu örneklerin her birinden toplam RNA'lar da ekstrakte edilmiştir. Ekstrakte edilen RNA'lar -80⁰C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.1. Materyalin CaCl₂'de muhafazası

Bu amaçla, iklim odasında yetiştirilen bitkilerden alınan yapraklar 0.5 cm²'lik parçalara kesilerek kağıt havlularla küçük paketler hazırlanmıştır. Paketlerin içerisine çeşidin adı, örnek numarası, hazırlanış tarihi ile ilgili bilgilerin yazıldığı etiketler de konulmuştur. Hazırlanan paketler, 2/5'i kadar CaCl₂ içeren kavanozlara yerleştirilmiş ve kavanozun kapağı sıkıca kapatılıp parafilm ile sarılarak +4⁰C'de bitki dokuları kuruyuncaya kadar 3-4 hafta muhafaza edilmiştir. Kurutma işlemi sırasında CaCl₂ ile bitki dokularının teması nlenmiştir. Kuruyan bitki dokuları daha sonra toz haline getirilerek kağıt zarflar içerisinde +4⁰C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3. ELISA Testinin Uygulanması (DAS-ELISA)

İklim odasında yetiştirilen tüm patates çeşitlerinden alınan yaprak örneklerinden 1 g doku tartılmış ve içinde tlbent olan ekstraksiyon torbalarına koyulmuş ve bir silindir yardımıyla 10 ml sulandırılarak tampon çözeltisi ile ezilmiştir. Ekstraktlar kullanılmışca kadar buzdolabında saklanmıştır.

Serolojik çalışmalarda "Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immuno Assay-ELISA" (DAS-ELISA) yöntemi kullanılmıştır (Clark ve Adams, 1977). Yapılan ELISA testlerinde LOEWE (Almanya) firmasından temin edilen PVY, PVS ve PVX poliklonal antiserum kitleri kullanılmıştır. Her virüs için firmanın protokolünde belirtmiş olduğu antiserum sulandırma oranları dikkate alınmıştır. Standart ELISA testi aşağıdaki şekilde uygulanmıştır:

1) Gamma globulinler, kaplama tamponu ile 1/200 oranında sulandırılmış ve mikrotiter ELISA plakalarının her bir çukuruna 100 µl konulmuştur. Plakaların üzeri kapatılarak buharlaşma engellenmiş 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, gamma globulin ile kaplanmış mikrotiter 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 numarada belirtildiği şekilde yıkanmıştır.

5) Konjugat tamponu ile konjugatlar 1/200 oranında sulandırılarak her bir çukura 100 µl konulmuş ve 37 °C'de 4 saat inkübe edilmiştir.

6) İnkübasyondan sonra plakalar 2 numarada belirtildiği şekilde yıkanmıştır.

7) Substrat tamponu ile taze olarak hazırlanan substrattan (1 mg/ml p-nitrophenyl phosphate) her bir çukura 100 µl konulmuş ve oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. Renk değişimine bağlı olarak 30, 60, 120 dakika sonra plakalar mikropilaka optik okuyucusunda 405 nm dalga boyunda okunmuştur.

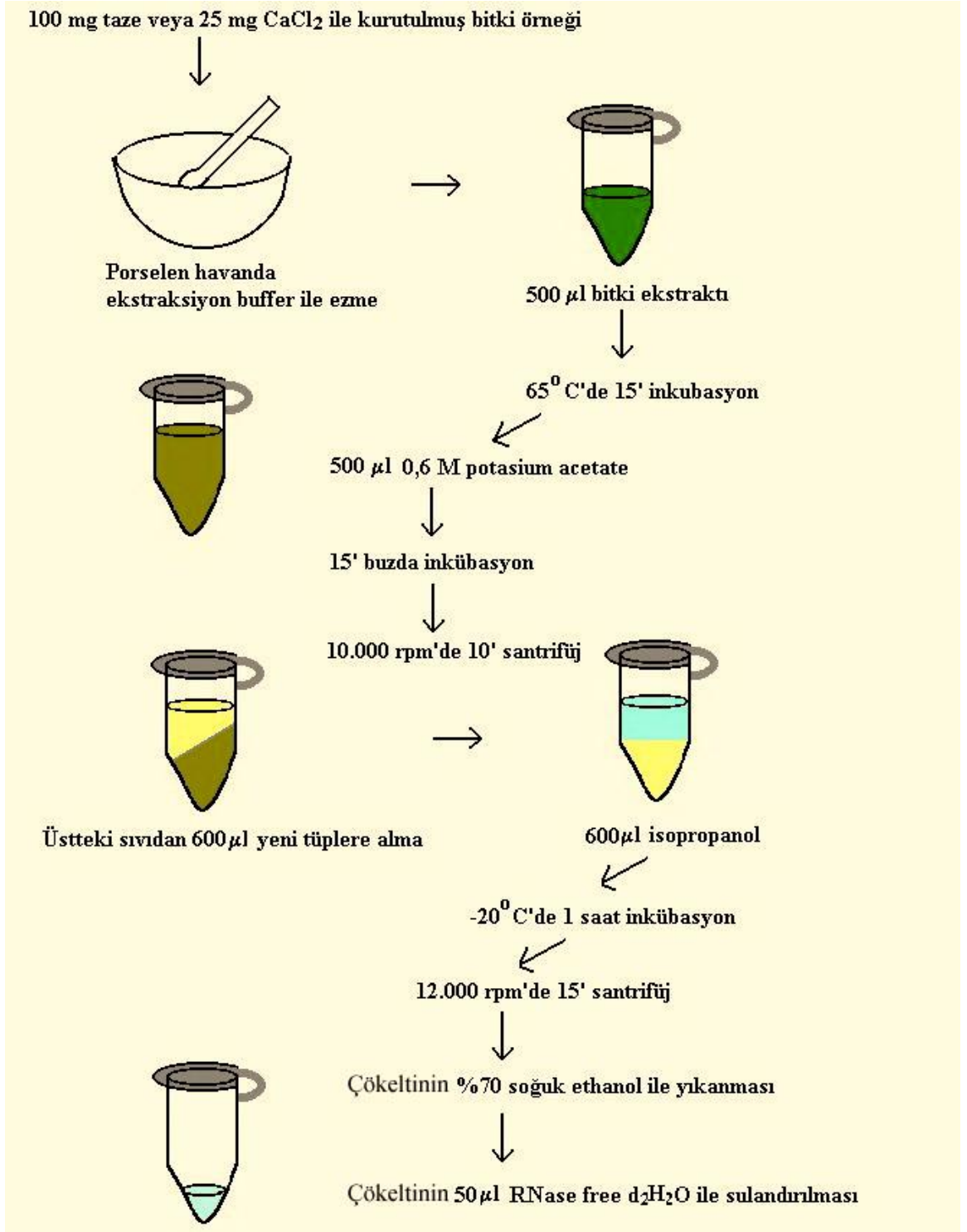
405 nm dalga boyunda okunan absorbans değerlerine göre sağlıklı kontrol değerinin en az iki katı ve daha yukarı okuma değeri veren örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir (Clark, 1981). Absorbans değerleri SEAC-SIRIOS marka ELISA okuyucusunda okunmuştur.

3.2.4. PCR Çalışmaları (Polymerase Chain Reaction=Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

3.2.4.1. Nükleik Asit İzolasyonu

Bu amaçla Spiegel ve ark. (1996)'nın lityum klorür metodu kullanılmıştır.

- 100 mg bitki materyali 5 hacim RNA ekstraksiyon ortamına (200 mM Tris-HCl, pH 8.5, %1.5 Sodium dodecylsulphate, 300 mM Lithium chloride, 1.0mM EDTA, %1 Sodium deoxycholate, %1 Igepal CA-630), %0.5 2-mercaptoethanol eklenerek porselen havanda ezilmiştir.
- Elde edilen ekstrakt 1.5 ml'lik eppendorf tüplere aktararak 65 °C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra eşit hacimde 6M Potasyum asetat (pH 6.5) eklenerek 15 dakika buzda inkübasyona bırakılmıştır.
- 10 000 rpm'de 15 dakika santrifüj (Hettich 32R) uygulamasından sonra üstte toplanan sıvınının 600 µl'si yeni eppendorf tüplere aktararak eşit hacimde iso-propanol eklenmiştir.
- 1 saat veya tüm gece -20°C'de inkübasyondan sonra 15 000 rpm'de 15 dakika santrifüj uygulanarak tüpün dip kısmında toplanan RNA çökeltisi 1 ml soğuk %70 etanol ile yıkanarak ortam koşullarında kurutulmuş ve daha sonra 30-50 µl steril bi-destile (d₂H₂O) su ile çözünmesi sağlanmıştır.
- Elde edilen toplam RNA, RT-PCR reaksiyonunda kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Nükleik asit izolasyonunun şematik gösterimi (Ulubaş, 2003).

3.2.4.2. Spesifik Primer çiftleri

PVY, PVX ve PVS'ye spesifik primer çiftleri Çizelge 3.1' de verilmiştir.

Çizelge 3.1. PVX, PVY ve PVS'e spesifik primer çiftleri

Primer Adı	Replikasyon Yönü	Dizilimi	Fragment Büyüklüğü (bp)	Referans
PVY strains	sense	ACGTCCAAAATGAGAATGCC	480	Nie and Singh,2002
	antisense	TGGTGTTTCGTGATGTGACCT		
PVX	sense	AGGCCACAGGGTCGACTAC	645	Singh,1999.
	antisense	TTGTTGTTCCAGTGATACGACC		
PVS	sense	TGGCGAACACCGAGCAAATG	187	Matousek ve ark., 2000
	antisense	ATGATCGAGTCCAAGGGCACTG		

3.2.4.3. Revers Transkripsiyon (RT; Reverse Transcription)

PVS ve PVX'in testlenmesi (Revers transkripsiyon aşaması), revers transkriptaz enziminin sağlandığı firmanın önerilerine göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, tek reaksiyon için 4 µl (4-5 µg) RNA, 1 µl 25 pmol/µl virüs spesifik (PVS) revers primer ile son hacim 11 µl olacak şekilde PCR tüpüne karıştırılarak 70°C'de 5 dakika inkübasyondan sonra hemen buza konulmuştur. Daha sonra üzerine ayrı bir tüpte son hacmi 19 ml olacak şekilde hazırlanan 4 µl 5x reaksiyon ortamı, 2 µl 10 mM dNTP mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 20 U RNase inhibitörü (MBI Fermentas) eklenmiştir.

37°C'de 5 dakika inkübasyondan sonra 200 U RevertAid M-MuLV (MBI Fermentas) revers transkriptaz enzimi eklenmiş ve tüpler 42°C'de 1 saat reverse transkripsiyon işlemi gerçekleştirilmiş ve reaksiyonu durdurmak için 70°C'de 10 dakika bir son adım uygulanarak cDNA (komplementer DNA)'lar elde edilmiştir (şekil 3.2.). Daha sonra cDNA'lar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

PVY'nin RT aşamasında ise, 2 µl 100 mM Random hexamer primer, 2 µl 0.5 mg/µl Oligo dT Primer ve 4.5 µl d₂H₂O ve 5 µl RNA karışımı 70°C'de 10 dak tutulmuş ve tüpler hemen buz üzerine konulmuştur. Tüplere 4 µl 5xRT Buffer, 2 µl 10 mM dNTP karışımı ve 0.5 µl RT eklenerek tüpler 37°C'de 10 dak, 42 °C'de 1 saat ve 70 °C'de 10 dak tutulduktan sonra elde edilen cDNA'lar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Viral nükleik asit izolasyonu (RNA.)



Hedef RNA
Reverse primer
dNTP's (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
Reaksiyon ortamı



Hedef RNA



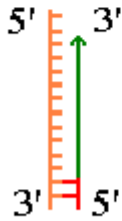
Denatürasyon (72 °C)



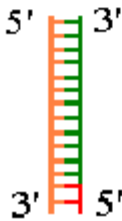
Annealing
(Primerin bağlanması, 37 °C)



Revers Transkriptaz'ın Eklenmesi



cDNA sentezi (37-45°C)



RNA-cDNA hibriti

Şekil 3.2. Revers transkripsiyonun şematik olarak açıklanması (Ulubaş, 2003).

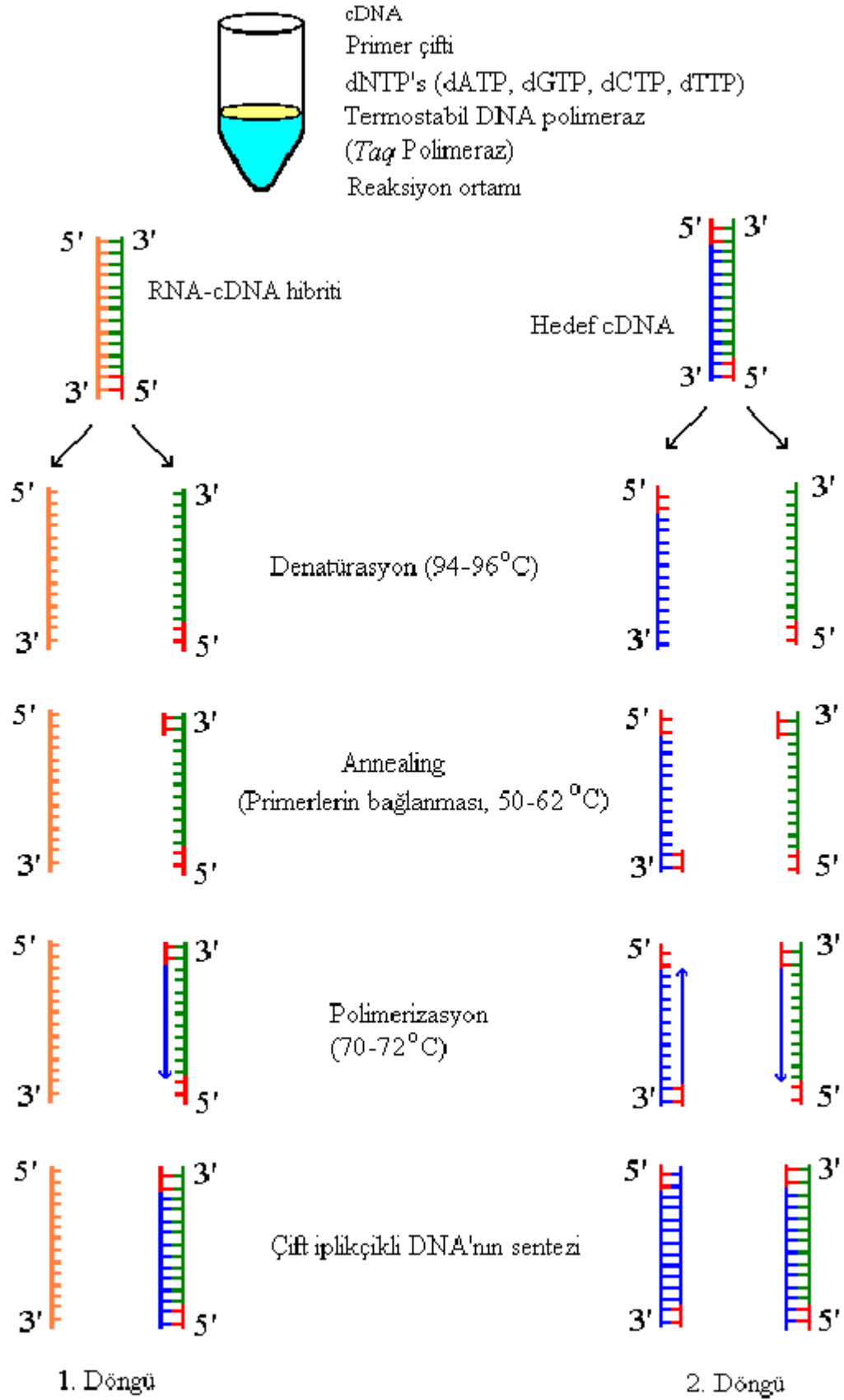
3.2.4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PVS için her bir reaksiyon karışımı toplam 25 µl'den oluşmuştur. Tek bir reaksiyon karışımı, 2 µl cDNA, 1'er µl virüs spesifik primer çifti (her biri 20 pmol/µl), 2.5 µl 2.5 mM dNTP'ler, 0.2 µl 25 mM MgCl₂, 2.5 µl 10xreaksiyon ortamı (MBI Fermentas; 100 mM Tris HCl pH 8.8, 500 mM KCl, %0.8 Nonidet P40), 0.35 U Taq DNA polimeraz (Promega) ile hazırlanarak Thermocycler (Techne Progene)'a yerleştirilmiştir. Amplifikasyon için thermocycler 1 döngü 94°C'de 3 dakika, 35 döngü 94°C'de 1 dak, 64 °C'de 1 dakika, son olarak 72 °C'de 1 dakika olarak programlanmıştır.

PVX için her bir reaksiyon karışımı toplam 25 µl'den oluşmuştur. Tek bir reaksiyon karışımı, 2 µl cDNA, 0.5 µl virüs spesifik primer çifti (her biri 20 pmol/µl), 2 µl 2.5 mM dNTP'ler, 0.5 µl 25 mM MgCl₂, 2.5 µl 10xreaksiyon ortamı (MBI Fermentas; 100 mM Tris HCl pH 8.8, 500 mM KCl, %0.8 Nonidet P40), 0.35 U Taq DNA polimeraz (Promega) ile hazırlanarak Thermocycler'a yerleştirilmiştir. PVS için uygulanan amplifikasyon programı PVX'e de uygulanmıştır.

PVY için; 20 µl'lik PCR karışımında 13.6 d₂H₂O, 2 µl 10xB, 1.6 µl 2.5 mM dNTPmix, 1.2 µl 25 mM MgCl₂, virüse spesifik primer çiftlerinin (20 pmol/µl) her birinden 0.5 µl ve 0.35 U Taq DNA polimeraz karıştırılmış ve 1 µl cDNA eklenerek 1 döngü 94°C'de 3 dakika, 40döngü 94°C'de 30 saniye, 54 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 1 dak ve son olarak 72 °C'de 10 dakika olarak programlanmış thermocyclere yerleştirilmiştir (Şekil 3.3.).

PCR ürünlerinin %1-1.5 agaroz jelde elektroforezi yapıldıktan sonra etidyum bromid ile boyanarak UV transillüminatörde sonuçlar gözlenmiştir.



Şekil 3.3. PCR'nin şematik olarak açıklanması (Ulubaş, 2003).

3.2.4.5. PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi : Jel Elektroforez

RT-PCR rnlerinin görsel hale getirilmesi amacıyla, reaksiyondan sonra ürünlerin %1-1,5 agaroz jelde elektroforez işlemi yapılmıştır. Elektroforez 0.5XTAE ortamında yapılmış, aynı ortam jelin hazırlanmasında da kullanılmıştır. Jele 3 l yükleme ortamı (6X; 15 ml için 150 mg bromophenol blue, 18 g gliserol, 6 ml 50XTAE) ile birlikte 10 l yüklenen RT-PCR rnleri, 120 V'da 35 dk süreyle elektroforeze tabi tutulmuştur. İşlem bittikten sonra jel 1 mg/ml etidyum bromid (EtBr) içeren 0.5XTAE ortamında 5-10 dakika EtBr ile boyanmıştır. Daha sonra UV transillmnatrde sonuçlar gözlenerek polaroid fotoğrafları çekilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Patates Yumrularının Filizlendirilmesi

Bu çalışmada ülkemizde yetiştirilen önemli tohumluk patates çeşitlerinde Patates X virüsü (PVX), Patates Y virüsü ve Patates S virüsü (PVS)'nin saptanması amacıyla Lady Rosetta'dan 22, Lady Olimpia'dan 24, Russet Burbank'tan 25, Hermes'ten 60, Panda'dan 99, Lady Claire'den 26 ve Granola'dan 48 adet olmak üzere toplam 304 yumru testlenmiştir.

Toplanan yumrular filizlendirildikten (Şekil 4.1) sonra gelişen yapraklardan ELISA ve RT-PCR testleri yapılarak PVY, PVX ve PVS'nin çeşitlerdeki oranları belirlenmiştir. Filizlenen yumrularda virüslere özgü herhangi bir simptom gözlenmemiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Yeni filizlenmeye başlayan patates yumruları



Şekil 4.2. Simptom gelişimi için gözlemlenen bitkiler

4.2. DAS-ELISA

DAS-ELISA sonuçlarına göre 8 farklı patates çeşidinden alınan 304 yumru testlendiğinde 39 örnek PVY, 11 örnek PVS ile enfekteli bulunmuştur. Ancak testlenen örneklerin hiçbirisinde PVX tespit edilememiştir (Çizelge 4.1).

Lady Rosetta patates çeşidinden testlenen 22 yumrunun 1 tanesi PVY ile enfekteli bulunurken, PVS ve PVX saptanamamıştır. Lady Olimpia patates çeşidinden testlenen 24 yumruda her üç virüs enfeksiyonu da bulunamamıştır. Russet Burbank patates çeşidinde testlenen 25 yumrunun 17 tanesinin PVY ile enfekteli olduğu ortaya koyulmuştur, fakat PVS ve PVX enfeksiyonları tespit edilememiştir. Hermes patates çeşidinden testlenen 60 yumrunun 2 tanesi PVY ile enfekteli olarak saptanırken, PVS ve PVX enfeksiyonu saptanamamıştır. Panda patates çeşidinden testlenen 99 yumrunun 8

tanesi PVY, 9 tanesi PVS ile enfekteli olduğu tespit edilirken hiçbir çeşitte PVX enfeksiyonuna rastlanmamıştır. Lady Claire patates çeşidinden testlenen 26 yumrunun 1 tanesi PVS ile enfekteli olduğu saptanırken PVY ve PVX enfeksiyonları bulunamamıştır. Granola patates çeşidinden testlenen 48 yumrunun 11 tanesi PVY, 1 tanesi PVS ile enfekteli olduğu bulunurken hiçbir yumruda PVX enfeksiyonu tespit edilememiştir.

Çizelge 4.1. DAS-ELISA ile testlenen farklı patates çeşitleri ve çeşitlerde saptanan virüsler

Çeşit adı	Testlenen bitki sayısı	Pozitif saptanan örnekler					
		PVY	%Enf. oranı	PVS	%Enf. oranı	PVX	%Enf. oranı
Lady Rosetta	22	1	4.54	-	-	-	-
Lady Olimpia	24	-	-	-	-	-	-
Russet Burbank	25	17	68	-	-	-	-
Hermes	60	2	3.34	-	-	-	-
Panda	99	8	8.08	9	9.09	-	-
Lady Claire	26	-	-	1	3.84	-	-
Granola	48	11	22.91	1	2.08	-	-
Toplam	304	39	12.82	11	3.61	-	-

4.3. RT-PCR Testlemeleri

DAS-ELISA ile testlenen 304 patates yumrusu PVY, PVS ve PVX virüsleri açısından RT-PCR ile de testlenmiştir. RT-PCR ürünleri %1-1,5 agaroz jelde elektroforez işlemi ile görsel hale getirilmiştir.

Testler sonucunda DAS-ELISA ile pozitif olarak saptanan örneklerin tamamı RT-PCR testi ile de pozitif olarak tespit edilmiştir. Bunun dışında DAS-ELISA ile negatif tespit edilen 6 örnek PVY, 10 örnek PVS ve 2 örnek de PVX ile enfekteli olarak

belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Serolojik olarak pozitif olup da RT-PCR ile negatif sonuç veren hiçbir örnek saptanamamıştır.

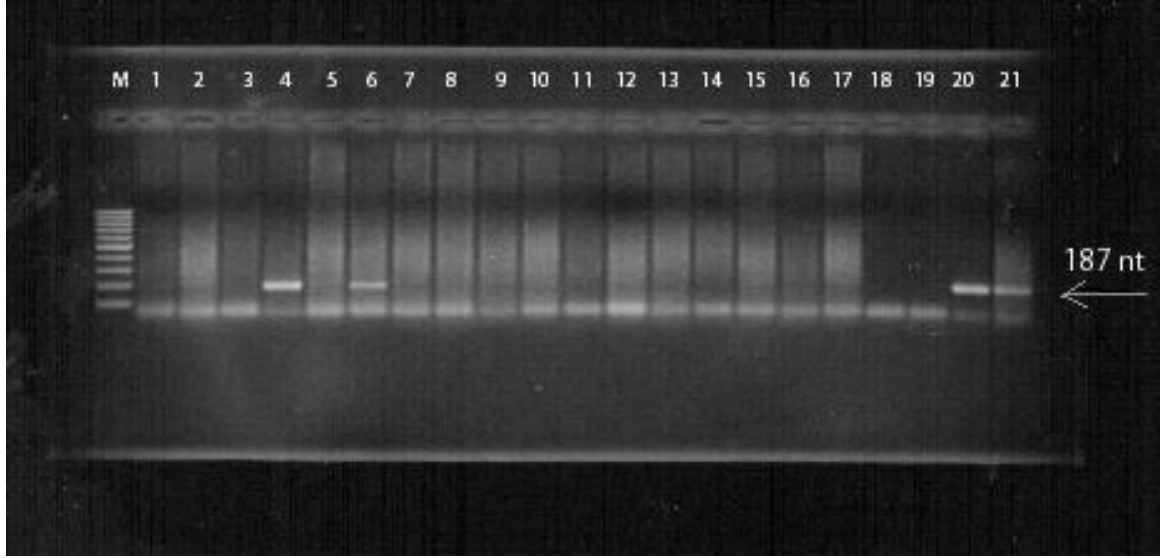
RT-PCR ürünleri %1-1,5 agaroz jelde elektroforez işlemi ile görsel hale getirilmiştir. Lady Rosetta patates çeşidinden testlenen 22 yumrunun 1 tanesi PVY ile 1 tanesi PVS ile enfekteli bulunurken, testlenen yumrulara PVX saptanamamıştır. Lady Olimpia patates çeşidinden testlenen 24 yumruda her üç virüs enfeksiyonu da bulunamamıştır. Russet Burbank patates çeşidinden testlenen 25 yumrunun 17 tanesinin PVY, 1 tanesinin PVS ile enfekteli olduğu ortaya koyulmuştur, PVX enfeksiyonu tespit edilememiştir. Hermes patates çeşidinden testlenen 60 yumrunun 3 tanesinin PVY, 1 tanesinin ise PVS ile enfekteli olduğu saptanırken 1 tanesinde PVX enfeksiyonu saptanmıştır. Panda patates çeşidinden testlenen 99 yumrunun 14 tanesi PVY, 15 tanesi PVS ile enfekteli olduğu tespit edilmişken sadece 1 yumruda PVX enfeksiyonu ortaya koyulmuştur. Lady Claire patates çeşidinden testlenen 26 yumrunun 2 tanesi PVY, 3 tanesi PVS ile enfekteli olduğu ortaya konulmuş ancak PVX enfeksiyonu saptanamamıştır. Granola patates çeşidinden testlenen 48 yumrunun 10 tanesi PVY, 1 tanesi PVS ile enfekteli olduğu bulunurken hiçbir yumruda PVX enfeksiyonu tespit edilememiştir.

Yapılan PCR çalışmaları sonucunda testlenen 304 örnekte %15.46 oranında PVY, %7.23 oranında PVS ise ve %0.66 oranında PVX ile bulaşık olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Patates yumrularında PVY, PVS ve PVX'e karşı gerçekleştirilen RT-PCR sonuçları

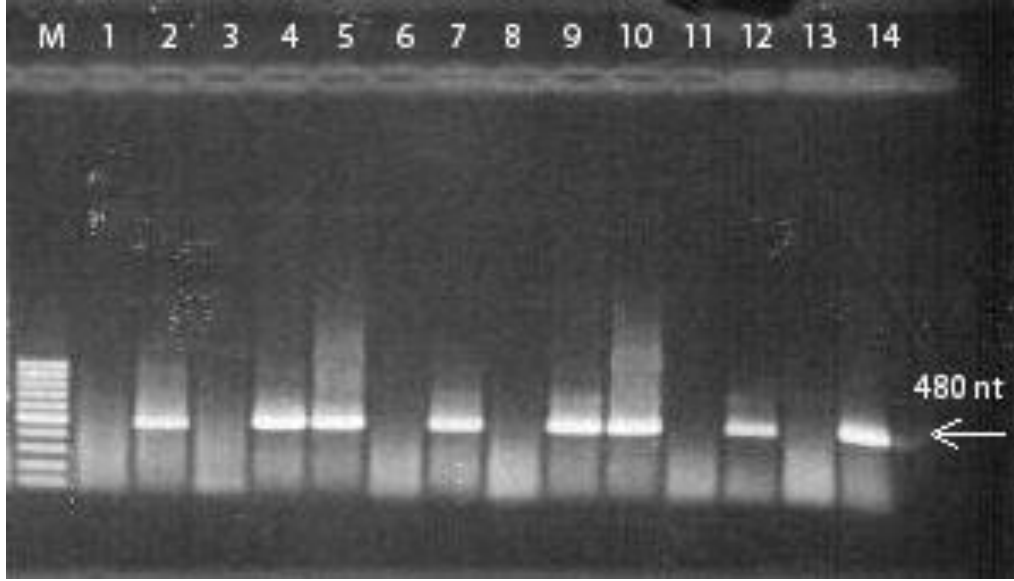
Çeşit adı	Testlenen bitki sayısı	Pozitif saptanan örnekler					
		PVY	% Enf. oranı	PVS	% Enf. oranı	PVX	% Enf. oranı
Lady Rosetta	22	1	4.54	1	4.54	-	-
Lady Olimpia	24	-	-	-	-	-	-
Russet Burbank	25	17	68	1	4	-	-
Hermes	60	3	5	1	1.6	1	1.66
Panda	99	14	14.14	15	15.15	1	1
Lady Claire	26	2	7.69	3	11.53	-	-
Granola	48	10	20.83	1	2.08	-	-
Toplam	304	47	15.46	22	7.23	2	0.66

PVS'nin genomunda yaklaşık 187 nt uzunluğunda bir kısmını amplifiye eden primerlerle test edilen tüm örneklerde beklenen seviyede spesifik band elde edilmiştir (Şekil 4.3). Beklenen spesifik band dışında pozitif kontrolde de başka bir band oluşmamıştır. Negatif RNA ve su kontrollerin herhangi bir band oluşumu görülmemiştir.



Şekil 4.3. PVS'e karşı gerçekleştirilen RT-PCR sonucu M: Marker, (MBI Fermentas, #SM0383); 4, 6, 21: PVS pozitif saptanan örnekler; 1,2,3,5,7,8,9,10,11,12, 13, 14,15,16,17: PVS negatif saptanan örnekler; 18: Su kontrol; 19: PVS negatif kontrol; 20: PVS pozitif kontrol.

PVY'nin genomunda yaklaşık 480 nt uzunluğunda bir kısmını amplifiye eden primerlerle test edilen tüm örneklerde beklenen seviyede spesifik band elde edilmiştir (Şekil 4.4). Beklenen spesifik band dışında pozitif kontrolde de başka bir band oluşmamıştır. Negatif RNA ve su kontrollerde herhangi bir band oluşumu görülmemiştir.



Şekil 4.4. PVY'e karşı gerçekleştirilen RT-PCR sonucu. M: Marker, (MBI Fermentas, #SM0383); 2, 4, 5, 7, 9, 10, 12: PVY pozitif saptanan örnekler; 1,3,6,8: PVY negatif saptanan örnekler; 11: Su kontrol; 13: PVY negatif kontrol 14: PVY pozitif kontrol.

PVX'in genomunda yaklaşık 645 nt uzunluğunda bir kısmını amplifiye eden primerlerle test edilen tüm örneklerde beklenen seviyede spesifik band elde edilmiştir (Şekil 4.5). Beklenen spesifik band dışında pozitif kontrolde de başka bir band oluşmamıştır. Negatif RNA ve su kontrollerde herhangi bir band oluşumu görülmemiştir.



Şekil 4.5. PVX'e karşı gerçekleştirilen RT-PCR sonucu. M: Marker, (MBI Fermentas, #SM0383); 1, 2, 3, 4, 5, 6: PVX negatif saptanan örnekler; 7: PVX pozitif saptanan örnek, 8: PVX pozitif kontrol; 9: PVX negatif kontrol.

Lady Rosetta, Lady Olimpia, Russet Burbank, Hermes, Panda, Lady Claire ve Granola çeşitlerinden alınan yumrulardaki PVY, PVS ve PVX'in saptanması amacıyla ELISA ve RT-PCR çalışmaları yapılmış ve testlenen örneklerdeki virüslerin oranları belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda RT-PCR moleküler testinin ELISA'ya göre daha hassas olduğu görülmüş ve elde edilen bulgular daha önce ülkemizde patates virüslerinin saptanması konusunda yapılmış olan bir çok araştırmanın sonuçlarını destekler nitelikte olmuştur.

Yurdumuzun hemen her bölgesinin patates yetiştiriciliğine uygun olması, iç talebin giderek artması ve patates dikim alanlarının genişlemesine bağlı olarak sertifikalı tohumluk ihtiyacı gittikçe artmaktadır. Patatesin vejetatif yolla üretilmesi tohumluğun önemini gittikçe arttırmaktadır. Kimyasal mücadele yöntemi olmayan virüs hastalıkları ile bulaşık patates yumrularının kullanılması halinde virüsler yıldan yıla ve bölgeden bölgeye taşınmaktadır. Bazı virüs hastalıklarının patatesteki belirti oluşturmaması veya oluşan belirtilerin birbirine benzemesi nedeniyle semptomlarına bakılarak virüsleri teşhis etmek oldukça zor ve yanıltıcı olmaktadır. Bu nedenle patates örneklerinin test edilmesi için hassas hızlı ve güvenilir metodlarla teşhis edilmesi gereklidir.

Ayrıca döviz karşılığı yurt dışından sağlanan ve sağlıklı oldukları düşünülen sertifikalı patates tohumluklarının da virüs hastalıklarıyla bulaşık olabileceği göz önüne alınarak gerek tohum ithal eden firmacıların gerekse üreticilerin virüsler konusunda dikkatli olmaları gerekmekte özellikle de tohumluk dağıtımından önce örneklerin virüsleri açısından testlenmesi ve virüsten arı olan tohumlukların dağıtımının yapılması gerekmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın amacı olan hızlı, güvenilir, konuyla ilgili çalışantüm araştırmacıların kolayca uygulayabileceği, duyarlı ve orta maliyetli moleküler tanı yöntemlerinden PCR tekniğini kullanarak patateslerde PVY, PVX ve PVS'nin duyarlı tanısını yapmak ve bu tekniğin tanıdaki başarısını serolojik tanı tekniklerinden ELISA testi ile karşılaştırması sonucunda elde edilen bulgular aşağıda özetlenmiştir:

* Tohumluk patates olarak kullanılan Lady Rosetta, Lady Olimpia, Russet Burbank, Hermes, Panda, Lady Claire ve Granola çeşitlerinden alınan yumruların çimlendirilmesi sonucunda bitkilerde gözle görülür bir simptom elde edilememiştir. Bunun nedeni iklim odasında virüslerin simptom oluşturacağı şartlar sağlamamış olabilir yada virüsler yeterli yoğunluğa ulaşamayıp simptom verememiş olabilir.

* DAS-ELISA sonuçlarına göre 8 farklı patates çeşidinden alınan 304 yumru testlenmiş ve 39 örnek PVY, 11 örnek PVS ile enfekteli bulunmuştur. Ancak testlenen örneklerin hiçbirisinde PVX tespit edilememiştir.

* Yapılan RT ve PCR testleri sonucunda DAS-ELISA ile pozitif olarak saptanan örneklerin tamamı RT-PCR testi ile de pozitif olarak tespit edilmiştir. Bunun dışında DAS-ELISA ile negatif tespit edilen 8 örnek PVY, 11 örnek PVS ve 2 örnek PVX ile pozitif olarak belirlenmiştir. Serolojik olarak pozitif olup da RT-PCR ile negatif sonuç hiçbir örnekte tespit edilmemiştir.

* PVY enfeksiyonu %68 oranıyla Russet Burbank çeşidinde saptanırken bunu sırasıyla %22.91 ile Granola, %14.14 ile Panda, %7.69 ile Lady Claire, %5 ile Hermes ve %4.54 ile Lady Rosetta çeşidi enfekteli bulunmuştur.

* PVS enfeksiyonu %15.15 oranıyla Panda çeşidinde saptanırken bunu sırasıyla %11.53 ile Lady Claire, %4.54 ile Lady Rosetta, %4 Russet Burbank, %2.08 ile Granola ve %1.6 ile Hermes çeşidi enfekteli bulunmuştur.

* PVX enfeksiyonu Hermes ve Panda çeşitlerinde birer örnekte pozitif saptanmıştır. PVX ile pozitif saptanan Panda çeşidinden alınan örneğin PVY ile de pozitif olduğu saptanmıştır.

Diğer kültür bitkilerinde olduğu gibi patates üretiminin artırılması için birim alanda elde edilecek ürünün miktar ve kalitesinin artırılması için mevcut ekm

alanlarının iyileştirilmesi gerekir. Özellikle patates virüs hastalıkları açısından sertifikalı ve temiz tohumluk elde edilmesi ve yetiştirilmesi gereklidir. Bunun için sulama, gübreleme, toprak işleme, kaliteli tohumluk ve yüksek verimli çeşitlerin kullanılması gibi kültürel işlemler yanında patatesten verim kaybına neden olan hastalık, zararlı ve yabancı otlarla da bilinçli bir şekilde mücadele edilmesi gerekir.

Özellikle kimyasal mücadele imkanı olmayan virüs hastalıkları patates için büyük önem taşımaktadır. Ayrıca döviz karşılığı yurt dışından sağlanan ve sağlıklı oldukları düşünülen sertifikalı patates tohumlukları üretildikten sonra çiftçilere dağıtılmadan önce hızlı ve güvenilir teşhis yöntemleriyle testlendikten ve virüsten arındırıldıktan sonra üreticilere dağıtılmalıdır. Özellikle ithal edilmiş tohumluk patates üretiminde verimde %10-100 gibi önemli verim kayıplarına yol açan PVY (Salazar, 1996) gibi virüs hastalıkları yaprak bitleri ile etkili olarak yayılmakta ve bu vektörler patatesten bitkisinde doğrudan zarar oluşturmaktadırlar. Patates virüslerinin yayılmasını engellemek için vektörlerle kimyasal mücadele yapmak yanında vektör uçuşlarının olmadığı veya az olduğu yüksek alanlarda üretim bölgeleri kurmak ve patates alanlarında özellikle yaprak bitinin konukçusu olan yabancı otlarla mücadele etmek gereklidir.

Ayrıca, döviz karşılığı her yıl yurt dışından temin edilen ve sağlıklı olduğu düşünülerek hiçbir testleme yapılmadan üreticilere dağıtılan sertifikalı patates tohumlukları kullanıldığında virüs hastalıkları üretimin önemli bir sorunu haline gelmiş ve verim kayıpları giderek artış göstermiştir. Bunu önlemek için üreticilere tohumluk verilmeden önce gerekli kontroller yapılması ve karantina aşamasında ise hızlı ve güvenilir teşhis yöntemlerinin kullanılması gerekir. Ayrıca ülkemizde tohumluk patates yetiştirilecek üretim bölgelerimiz belirlenerek, üretim merkezlerimiz belirlenmelidir.

Yapılan bu çalışma kapsamında elde ettiğimiz virüs izolatlarının karakterizasyon çalışmalarının yapılması ve bu izolatların gen bankasında kayıtlı diğer izolatlarla karşılaştırılarak filogenetik akrabalıklarının belirlenmesi gelecekte yapılması planlanan çalışmalarımız arasındadır.

KAYNAKLAR

- Agrios, G. N. 1997. **Plant Pathology. Academic Press, Inc.** New York, USA. Pp 635.
- Anonim, 2006. <http://www.fao.org>.
- Arıoğlu, H., Çalışkan, M.E., Onaran, H., 2006. Türkiye’de patates üretimi, Sorunları ve Çözüm Önerileri. **IV. Ulusal Patates Kongresi**, 6-8 Eylül, Niğde, 1-10.
- Avila, A.C., Salazar, L.F., Hidalgo, O.A., Nakashima, J., Dusi, A. N., 1989. Serological techniques and antiserum production. **International Potato Center**, 17, 1-8.
- Azeri, T., Yalçın, O., Gündoğdu, M., Kaya, N., 1985. Tohumluk patates tarımının zirai mücadele yönünden sorunları. **Türkiye Sertifikalı ve Kontrollü Tohumluk Üretim ve Dağıtım Sorunları Sempozyumu**, 8-10 Şubat, İzmir. 451-461.
- Barker, H., Webster, K.D., Reavy, B., 1993. Detection of potato virus Y in potato tubers:a comparison of polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. **Potato Res.** 36, 13-20.
- Barker ve Woodford, 1992. Spread of potato leafroll virus is decreased from plants of potato clones in which virus accumulation is restricted. **Ann. Appl. Biol.**, 121, 345-354
- Beemster, A.B.R., A. Rozendal, 1972. Potato viruses properties and symptoms Viruses of Potatoes and Seed-Potato Production, (ed) by, J.A. Baks, PUDUC, Wageningen, p115-142.
- Bokx, J.A. de., J.C. Mool, 1974. Methods of quality assessment of seed potatoes. **Potato res.**, 17, 410-433.
- Boonham, N., Walsh, K., Smith, P., Madagan, K., Graham, I., Barker., 2003. Detection of potato viruses using microarray technology: towards a generic method for plant viral disease diagnosis. **Journal of Virological Methods** 108 (2003) 181-187.
- Bostan, H., 1996. **Erzurum yöresinde patates X ve S virüs hastalık oranları ile konukçu çevrelerinin belirlenmesi, bu etmenlerin dsRNA analizi ile tanılanması.** Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü (Basılmamış Yüksek Lisans tezi), 55 s.
- Bostan, H., S. Açıkgöz, 2000. Determination of PVX and PVS Symptoms on Some Test Plants and Identification of These Viruses Using dsRNA Analysis. **J. Turk. Phytopath.**, Vol.29, No.1, 41-47.
- Bostan, H., Demirci E., 2001. Patates X ve Y virüslerinin bazı patates çeşitlerinde neden olduğu simptomlar. **Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg.** 32 (1), 1-4
- Bostan, H., Haliloğlu K., 2004. Distribution of PLRV, PVS, PVX, and PVY (PVY^N, PVY⁰ and PVY^c) in the seed potato tubers in Turkey. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 7(7): 1140-1143.
- Bystricka, D., Lenz, O., Mraz, Piherova, L., Kmoch, S., Sip, M., 2005. oligonucleotide-based microarray a new improvement in microarray detection of plant viruses. **Journal of Virological Methods** 128 (2005)176-182.
- Clark, M.F., and Adams, A.N., 1977. Characteristics of the micro plate method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. **J. Gen. Virology**, 34: 475-483.

- Clark, M.F., 1981. Immunosorbent Assays in Plant Pathology. **Ann. Rev. Phytopathology** 19, 83-106.
- Cortbaoui, R., 1984. **Roguing Potatoes. Technical Information Bulletin 5**, International Potato center (CIP), Lima, Peru, p.13.
- Croslin, J.M., Hamm, P.B., Hane, D.C., Jaeger, J., Brown, C.R., Shiel, P.J., Berger, P.H., Thornton, R.E., 2006. The occurrence of PVY^O, PVY^N and PVY^{N:O} strains of potato virus Y in certified potato seed lot trials in Washington and Oregon. **Plant Disease** 90:8 1102-1105.
- Çalışkan, M.E., 2001. Farklı olgunlaşma grubuna giren bazı patates çeşitlerinin Hatay ekolojik koşullarındaki verim ve kalite özelliklerinin belirlenmesi. **MKU Ziraat Fakültesi Dergisi** 6(1-2) 39-50.
- Çıtır, A., 1982. Erzurum ve çevresindeki patates virüs hastalıkları ve bunların tanınması üzerinde bazı araştırmalar. **Doğa Bilim Dergisi: Vet. Hay. Tar. Orm.** 6(3): 99-109.
- Çıtır, A., Tugay, M.E., Doğanlar, M., Yılmaz, G., Eraslan, F., Kara, K. ve Çağatay, K. 1999. Tokat ilinde yayla ve ova koşullarında tohumluk patates üretimini sınırlayan zararlılar ve hastalıklar. **II. Ulusal Patates Kongresi.** 28-30 Haziran, Erzurum. 185-190.
- De Bokx, J.A., Cuperus, C., 1987. Detection of potato virus Y in early-harvested potato tubers by cDNA hybridization and three modifications of ELISA. **OEPP/EPPO Bulletin** 17: 73-79.
- DiFonzo, C.D., D.W. Ragsdale, E.B. Radcliffe, N.C. Gudmestad, G.A. Secor, 1996. Crop borders reduce potato virus Y incidence in seed potato. **Ann. Appl. Biol.**, 129, 289-302.
- Dolar, M.S., Tekinel, N. Ve Nas, Y.Z., 1976. Adana, Antalya, Gaziantep, Hatay, İçel ve Kahramanmaraş illeri patateslerinde virüs hastalıklarının ve kesafetlerinin simptomatolojik olarak tespiti üzerinde çalışmalar. **Bitki Koruma Bülteni.** 16: 2, 92-100.
- Gavran, M., 1997. Distribution of potato viruses in Yugoslavia. **Acta Hort.** 462:929-934.
- Gümüş, M., Erkan, S., 1998. Ayvalık ve Altınova Yörelerinde Üretilen Patates Çeşitlerinin Yumrularında Bulunan Virüslerin Belirlenmesi Üzerinde Araştırmalar. **Türkiye VIII. Fitopatoloji Kongresi Bildirileri**, Ankara, 348-350.
- Günel, E., 2002. Dünden yarına patates yetiştiriciliği. **III. Ulusal Patates Kongresi**, 23-27 Eylül, İzmir, 21-38.
- Halbert, S.E., J. Connelly, L.E. Sandvol, 1993. Suction trapping of aphids in western North America (emphasis on Idaho). **Acta Phytopathol Entomol Hungarica**, 25: 411-422.
- Hanafi, A., E.B. Radcliffe, D.W. Ragsdale, 1995. Spread and control of potato leafroll virus in the Souss Valley of Morocco. **Crop Protect.**, 14: 145-153.
- Harrington, R., R.W. Gibson, 1986. Field assessment of the relative importance of different aphid species in the transmission of potato virus Y. **Potato Res.**, 29: 67-76.
- Harrington, R., R.W. Gibson, 1989. Transmission of potato virus Y by aphids trapped in potato crops in southern England. **Potato Res.**, 32: 167-174.
- Heimbach U., T. Thieme, H.L. Weidemann, R. Thieme, 1998. Transmission of potato virus Y by aphid species which do not colonise potatoes. *In: Nieto*

- Nafria, J.M., and A.F.G. Dixon (eds), **Aphids in Natural and Managed Ecosystems**. Universidad de Leon, Leon, Spain, pp.555-559.
- Hu, C.Y., P.J. Wang, 1983. Meristem, Shoot Tip and Bud Cultures. **In: Handbook of Plant Cell Culture I. Techniques for Propagation and Breeding (Eds. Evans, D.H., Sharp W.R., Ammirato, P.V., Yawada, Y)**. McMillan Publ. Co., New York and London, 970p.
- Hooker, W.J., 1986. **Compendium of Potato Diseases**. American Phytopathological Society Pres., St. Paul, Minnesota, 125p.
- Horton, D., 1987. **Potatoes Production, marketing, and programs for developing countries**. Westview press, Boulder and IT Publications, London, 243 pp.
- İlhan, D., Özdemir, I., Akbaş, B., 2006. Patates alanlarında sorun olan virüs hastalıkları ve vektörü olan yaprakbitleri ile ilişkileri. **IV. Ulusal Patates Kongresi**, 6-8 Eylül, Niğde, 344-349.
- Jayasinghe, U., 1988. **Potato Leafroll Virus. Technical Information Bulletin**, 22; CIP, Lima, Peru, 1-22.
- Jones, E.D., 1988. A current assessment of in vitro culture and other rapid multiplication methods in North America and Europe. **Am. Potato J.**, 65, 209-220.
- Jones, R., Kumar, S., Mackie, A., 2003. Potato Virus Y. www.agric.wa.gov.au/pls/portal30/docs/FOLDER/IKMP/PW/PH/DIS/FS00203.PDF.
- Karaca, İ., 1961. Beitrage Zur Kenntnis der Viroseen, Bacteriosen und der parasitischen pilze der Turkei. **Atatürk Üniversitesi Yıllığı**, Erzurum.
- Kirkwood, I., 2002. www.dpiw.tas.gov.au/inter.nsf/WebPages/TTAR-5CL57C?open.
- Koerschneck, I., G. Himmler, R. Sagl, H. Steinkellner, H. Katinger, 1991. A PCR membrane spot assay for the detection of plum pox virus RNA in bark of infected trees. **J. Virol. Methods**, 31: 139-146.
- Kurçman, S. 1979. Ankara'nın Çubuk ilçesine bağlı bazı köylerde patateslerde görülen virüs hastalıkları. **Bitki Koruma Bülteni**. 19: 4, 181-190.
- Langeveld, S.A., Dore, J.M., Memelink, J., Derks, A.F.L.M., van der Vlugt, C.I.M., Asjes, C.J., Bol, J.F., 1991. Identification of potyvirus using the polymerase chain reaction with degenerate primers. **Journal of General Virology** 72: 1531-1541.
- Loebenstein, G., F. Akad, V. Filatov, G. Sadvakasova, A. Manadilova, H. Bakelman, E. Teverovsky, O. Lachman, A. Davida, 1997. Improved detection of potato leafroll luteovirus in leaves and tubers with a digoxigenin-labelled cRNA probe. **Plant Dis.**, 81: 489-490.
- McDonald, J.G., 1984. Viruses associated with mosaic symptoms in Russet Burbank burbank burbank potato. **Can J. of Plant Path.**, 6, 224-226.
- McMoran, J.P., T.C. Allen, 1983. Maintenance, symptoms and distribution of potato viruses X,S,Y,A and Leafroll in potato tissue culture plantlets. **Am. Potato J.**, 60, 389-847.
- MacGillivray, M.E., 1981. **In: Compendium of Potato Diseases**. The American Psychopathological Society, Paul, MN, pp. 101-103.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., 1982. **Molecular Cloning; A Laboratory Manual**. By Cold Spring Harbour Lab., ISBN 0-87969-136.

- Matoušek, J., J. Schubert, P. Didic and J. Ptáek, 2000. A broad variability of potato S carlavirus (PVS) revealed by analysis of RT-PCR amplified virus sequences. **Can. J. Plant Pathol.**, 22.
- Nie, X. and R.P. Singh, 2000. Detection of multiple potato viruses using an oligo(dT) as a common cDNA primer in multiplex RT-PCR. **Journal of Virological Methods** 86 (2000) 179-185.
- Nie, X. and R.P. Singh, 2002. A new approach for the simultaneous differentiation of biological and geographical strains of potato virus Y by uniplex and multiplex RT-PCR. **J. Virol Meth.**, 104: 41-54.
- Ötleş, S., Akçiçek, E., 2002. Patatesin beslenme ve sağlık yönünden önemi. **III. Ulusal Patates Kongresi**, 23-27 Eylül, İzmir, 1-12.
- Özalp, M.O., 1964. **Patates virüs hastalıkları**. Tarım Bakanlığı, Bornova Ziraat Mücadele Enstitüsü Yayınları. Teknik Bülten 13, İzmir, 35 s.
- Özbayram, Ç., 1982. Türkiye’de yetiştirici elinde bulunan patates tohumluluğunun virüs hastalıklarıyla bulaşıklık oranının saptanması üzerine araştırmalar, **EBZAE**, Menemen, İzmir.
- Özdemir, S., 2006. Afyon ili Sandıklı ilçesinde yetiştirilen patates yumrularında görülen virütik etmenlerin belirtilerinin saptanması, **IV. Ulusal Patates Kongresi**, 5-8 Eylül, 2006, Niğde
- Rowhani, A., M.A. Maningas, L.S. Lile, S.D. Daubert., D.A. Galino, 1995. Development of a detection system for viruses of wood plants based on PCR analysis of immobilized virions. **Phytopathology**, 85: 347-352.
- Russo, P., L. Miller, R.P. Singh, A.A. Slack, 1999. Comparison of PLRV and PVY deduction in potato seed samples tested by Florida winter field inspection and RT-PCR. **Am. J. Potato Res.**, 76: 313-316.
- Sahtiyancı, Ş., 1972. **Bitki virüs hastalıkları, Özel Kısım (Klinowski; 1958’den Tercüme)**. Bölge Ziraat Araştırma Enstitüsü Erenköy, İstanbul, 362 p.
- Sahtiyancı, Ş., 1990. **Tohumluk Patates Üretimi ve Patates Virüs Hastalıkları**. Matbaa Teknisyenleri Basımevi. Cağaloğlu, İstanbul, 284s.
- Salazar, L.F., 1996. **Potato Viruses and their Control**. CIP, Lima. 214 pp.
- Samson, R.G., Allen, T.C., Whitworth, J.L., 1993. Evaluation of direct tissue blotting to detect potato viruses. **Am. Potato J.**, 70, 257-265.
- Schilde-Rentschler, L., Schmiediche, P.E., 1984. Tissue Culture: Past, present and future. **International Potato Center**, 12p.
- Shepard, J.F., L.E. Claflin, 1975. Critical analyses of the principles of seed potato certification. **Ann. Rev. Phytopathology**, 13, 271-293.
- Singh, M., Singh, R.P., 1996. Factors affecting detection of PVY’nin dormant tubers of reverse transcription polymerase chain reaction and nucleic acid spot hybridization. **J. Virol. Methods** 60, 47-57.
- Singh, M., Singh, R.P., Moore, L., 1999. Evaluation of NASH and RT-PCR for the detection of PVY in dormant tubers and its comparison with visual symptoms and ELISA in plants. **Amer. J. of Potato Res.**, 75:61-66.
- Singh, R.P., 1999. **Development of the molecular methods for potato virus and viroid detection and prevention**. Genome 42: 592-604.
- Singh, R.P., Somerville, T.H., 1992. Evaluation of the enzyme-amplified ELISA for the deduction of potato viruses A,M , S, X, Y and leafroll. **Am. Potato J.**, 69: 21-30.

- Slack, S., 1995. Potato viruses with some implications for production and processing in the United States: a history of problems and solutions. **Summa Phytopathologica**, 21: 273-275.
- Spiegel, S., and Martin, R.P., 1993. Improved detection of potato leafroll virus in dormant potato tubers and micro tubers by the polymerase chain reaction and ELISA. **Ann. Appl. Biol.** 121: 493-500.
- Spiegel, S., Scott, S. W., Bowman-Vance, V., Tam, Y., Galiakparov, N.N. and Rosner, A., 1996. Improved detection of prunus necrotic ringspot virus by polymerase chain reaction. **Europ. J. Plant Pathol.**, 102: 681-685.
- Tahtacıoğlu, L., 1993. **Erzurum'da patatesteki afid (Homoptera: Aphidoidea) türleri, bunların populasyon değişimleri ve yeşil şeftali afidi (*Myzus persicae* Sulzer) ile patates yaprak kıvrılma virüsü (PLRV)'nün yayılması arasındaki bazı ilişkilerin tespiti üzerinde araştırmalar.** Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü (Basılmamış Doktora Tezi), 144 s.
- Thomas, P.E., Kaniewski, W.K., Lawson, E.C., 1997a. Reduced field spread of potato leafroll virus in potatoes transformed with the potato leafroll virus coat protein gene. **Plant Dis.**, 81:1447-1453.
- Thomas, P.E., K.S. Pike, G.L. Reed, 1997b. Role of green peach aphid flights in the epidemiology of potato leaf roll disease in the Columbia Basin. **Plant Dis.** 81: 1311-1316.
- Tovar, P., R. Estrada, L. Schilde-Rentschler, J.H. Dodds, 1985. Induction and use of *in vitro* potato tubers. **Internasyonel Potato Center**, 13, 1-3.
- Vunsh, R.A., A. Roster, A. Stein, 1990. The use of the polymerase chain reaction (PCR) for detection of bean yellow mosaic virus in gladiolus. **Ann. Appl. Biol.** 117 : 561-569.
- Walkey, D.G.A. 1991. **Applied Plant Virology.** St. Edmundsbury Pres, Bury St. Edmunds, Suffolk, USA, 338p.
- Woodford, J.A.T., 1988. The impact of cropping policy on methods to control potato leafroll virus. **Aspects Appl Biol.**, 17:163-171.
- Yılmaz, N.D.K., Yanar, Y., Çeşmeli, İ., Erkan, S. 2004. Tokat ilinde patates üretim alanlarında görülen virüs hastalıkları. **Türkiye I. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri**, Samsun, 214.
- Ulubaş, Ç., 2003. Sert çekirdekli meyve ağaçlarında enfeksiyon yapan İlarvirüslerin RT-PCR ile tanısı ve karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 95 s.
- Vetten, H.J., Ehlers, U., Paul, H.L., 1983. Detection of potato viruses Y and A in tubers by enzyme-linked immunosorbent assay after natural and artificial break of dormancy. **Phytopathologische Zeitschrift** 108: 41-53.
- Yardımcı, N., Bostan, H., 1999. Research on detection of viruses in potato plants tested by ELISA in Erzurum Province. **J. Turk. Phytopath.** 28 (3), 99-100.
- Yılmaz, N.D.K., Yanar, Y., Çeşmeli, İ., Erkan, S. 2004. Tokat ilinde patates üretim alanlarında görülen virüs hastalıkları. **Türkiye I. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri**, Samsun, 214.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında büyük bir titizlik, sabır ve özveriyle bana destek olan, yol gösteren ve iyi bir bilimsel çalışma ortamı sağlayan danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Mona GAZEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında değerli görüş, katkı ve bilgilerini esirgemeyen hocalarım sayın Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN, Yrd. Doç. Dr. Çiğdem ULUBAŞ SERÇE, Yrd. Doç. Dr. Feza CAN'a ve Yrd. Doç. Dr. E. Mine SOYLU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında büyük yardımlarını gördüğüm arkadaşım Ecz. Esra NAKIŞ MISIRLIOĞLU'na teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında manevi desteğini esirgemeyen, hayatımın her aşamasında bana her konuda destek olan özellikle değerli anneme ve babama, ayrıca kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Almanya/Krefeld'te doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Hatay'da tamamladım. 2003 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma bölümünden Ziraat Mühendisi ünvanıyla mezun oldum. 2003 yılında Havayolları Ticketing Uzmanlığı programını tamamladım ve bir süre ücretli öğretmenlik ve dersane öğretmenliği görevinde bulundum. 2004-2005 yılında İstanbul Atatürk Havalimanında Çelebi Handling A.Ş.'ye bağlı olarak OnurAir ve Atlas Jet Havayolları'nda Hava Trafik Memuru olarak görev yaptım.

2006 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Koruma A.B.D.'da yüksek lisans sınavını kazandım ve aynı yıl Mirioğlu Un Fabrikasında (Antakya) sorumlu müdür olarak çalışmaya başladım. 2007 yılında Mirioğlu Un Fabrikasından ayrıldım. Ortadoğu Teknik Üniversitesi-Teknokent ve Tekim'in açmış olduğu Yeni İş Geliştirme ve Yeni Ürün Geliştirme eğitim programlarını ayrıca Avrasya Global A.Ş.'nin "Liderlik, Yöneticilik, Ekip (Takım) Çalışması" kursunu tamamladım.

Ayrıca Yüksek Lisans eğitimim sürecinde 2006 yılında Antalya'da düzenlenen XX.. Uluslararası Ilıman İklim Meyveleri Virüs ve Virüs Benzeri Hastalıklar Sempozyumu ve XI. Uluslararası Küçük Meyvelerdeki Virüs Hastalıkları Sempozyumuna ve Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi'ne (2007) katıldım.

EKLER**Ek 1. ELISA Testinde kullanılan Tampon Çözeltiler****Fosfat Tamponu Salin (Phosphate Buffered Saline-PBS) pH: 7.4**

NaCl	8.0 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O	2.9 g
KCl	0.2 g

Yukarıda verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH'sı 0.1 NaOH veya 0.1 N HCl ile ayarlanmış ve 4°C'de saklanmıştır. Bu tampon çözelti 5 veya 10 kat konsantr olarak stok çözelti şeklinde hazırlanıp saklanabilir ve gerekli olduğunda aynı oranda sulandırılıp kullanılabilir.

Kaplama Tamponu (Coating Buffer) pH: 9.6

Na ₂ CO ₃	1.59 g
NaHCO ₃	2.93 g

Yukarıda verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH'sı ayarlanmış ve 4°C'de saklanmıştır. Ancak her kullanımda pH kontrol edilmiştir.

Yıkama Tamponu (Washing Buffer)

NaCl	8.0 g
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	2.9 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
KCl	0.2 g
Tween 20	0.5 ml

pH'sı 7.2-7.4'e ayarlanan 1 litre PBS tamponuna 0.5 ml Tween-20 ilave edilerek hazırlanmıştır.

Örnek Tamponu (Sample Buffer)

Polyvinyl pyrrolidone (viscosity K10-K40)	20 g
Bovine serum albumin	2.0 g
NaN ₃	0.1 g
Yıkama tamponu	1.0 l

1 litre tampon çözeltisi içerisine 20 g (%2) Polyvinylpyrrolidone 40.000 (PVP-40) ilave edilerek hazırlanmıştır (1 ay içerisinde kullanılmak üzere 4°C’de saklanabilir).

Substrat Tamponu (Substrate Buffer) pH: 9.8

Diethanolamine	97 ml
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0.2 g

97 ml Diethanolamine 800 ml saf su içerisine ilave edilir. Sonra 0.2 g NaN₃ eklenir ve HCl ile pH 9.8’e ayarlanarak 1 litreye tamamlanır (karanlıkta 4°C’de saklanabilir ancak kullanılmadan önce pH kontrol edilmelidir).

Substrat Solusyonu (Substrate Solution)

4-nitrophenyl phosphate	1 mg/ml
di-Na-salt	

Ek 2. Nükleik Asit İzolasyonunda Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması**0.5 M EDTA , pH: 8.0**

0.0145 g EDTA 100 ml d₂H₂O'da eritilir. Magnetik karıştırıcı ile kuvvetle karıştırılır. pH'sı NaOH pelletleri ile 8.0'a ayarlanır. Otoklav edilir, oda sıcaklığında saklanır.

5 M KOAc , pH: 6.0

29.445 g KOAc 60 ml saf suda çözündürülür. Glacial asetik asit damlatılarak pH 6.0'a ayarlanır. Suyla 100 ml'ye tamamlanır.

3 M NaOAc , pH: 5.2

40.8 g NaOAc 100 ml'ye su ile tamamlanır.

Yıkama Tamponu (Wash Buffer)

10 mM Tris-HCl , pH:7.5

0.5 mM EDTA

50 mM NaCl

50% Ethanol (EtOH)

10 mM Tris-HCl , pH:7.5

0.121 g Trizma base 80 ml d₂H₂O ile çözündürülür. pH konsantre HCl eklenerek istenen seviyeye getirilir. 100 ml'ye d₂H₂O eklenerek tamamlanır ve otoklavda steril edildikten sonra oda sıcaklığında rutin kullanımlar için 3-4 aya saklanır.

50 mM NaCl

0.29 NaCl içerisine saf su eklenerek 50 ml'ye tamamlanır.

Ek 3. AGAROSE JEL ELEKTROFOREZ (Maniatis ve ark., 1982)**TAEX50**100 ml stok için:

Trizma base	242 g
0.5 EDTA pH:8.0	10 ml
0.6 glacial acetic acide	5.71 ml

TAE tampon hazırlamada, 242 g Tris base steril behere konur üzerine 5.71 ml Glacial acetic acid ve 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)'dan koyarak steril su ile 1 litreye tamamlanır. Otoklavda steril edilerek oda sıcaklığında saklanır.

Yükleme Ortamı15 ml 6X stok için

150 mg Bromophenol blue
18 g Glycerol
6 ml TAEX50
-20°C'de saklanır.

Ethidium Bromide Solüsyonu1 mg/ml 200 ml stok için

200 ml 0.5XTAE

200 µl Ethidium Bromide (Sigma E-1510) (son konsantrasyon 1 mg/ml)

Koyu renkli bir kap içine karanlık ortamda oda sıcaklığında saklanır. 5-10 defaya kadar aynı solüsyon kullanılabilir. Daha sonraki kullanımlar için tazelenmelidir.

% 1 Agarose Jel Elektroforezi

1 g agaroz, 100 ml 0.5XTAE içinde mikrodalga fırında eritilmiştir. Yaklaşık 40°C sıcaklığa geldikten sonra, elektroforez ünitesinin jel tepsisine dökülerek agarozun donması beklenmiştir (15-20 dk). 0.5XTAE ortamı içeren elektroforez tankına yerleştirilen agaroz jelin çukurlarına PCR ürünleri yüklenmiştir. Örnek yüklemesi, 5-10 µl PCR ürünü ve 3 µl yükleme ortamı ayrı bir yerde karıştırılarak yapılmış. PCR ürünlerinin 120 V'da 1 saat elektroforezinden sonra ethidium bromide solüsyonu ile jel 5-10 dk boyanmış ve UV transillüminatörde sonuçlar gözlenmiştir. Kamera ile polaroid fotoğraf çekilmiştir.